はじめに

当該学位論文は、以下の２つの既刊論文をまとめたものである。

第Ⅱ章は、John Wiley & Sons Inc. が出版したものである。
Asakawa T, Esumi M, Endo S, Kida A, and Ikeda M.　Tongue cancer patients have a high frequency of allelic loss at the von Hippel-Lindau gene and other loci on 3p. Cancer 112(3): 527-534, 2008

第Ⅲ章は、BioMed Central, The Open Access Publisher が出版したものである。
Asakawa T, Esumi M, Endo S, Kida A, and Ikeda M.　A mutation at IVS1+5 of the von Hippel-Lindau gene resulting in intron retention in transcripts is not pathogenic in a patient with a tongue cancer? BMC Medical Genetics 13:23, 2012

舌扁平上皮癌における染色体 3p 領域の遺伝子異常

日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学系

耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

浅川　剛志

申請年（2012 年）

指導教員　江角　眞理子

舌扁平上皮癌における染色体 3p 領域の遺伝子異常

日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学系

耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

浅川　剛志

申請年（2012 年）

指導教員　江角　眞理子

目　次

第Ｉ章　序論

1.はじめに

本論文は二つの研究からなる。一つは、舌扁平上皮癌における染色体 3p 領域の遺伝子異常について解析を行った。この染色体領域には高頻度に、*VHL* がん抑制遺伝子を含む複数カ所の欠失が認められることを見いだした。二つ目は、*VHL* がん抑制遺伝子の生殖細胞系列点突然変異を認めた舌扁平上皮癌の 1 症例について検討を行った。イントロン領域に見られた珍しい点突然変異が、*VHL* mRNA のスプライシング異常を起こすことをはじめて証明した。さらにこの症例の VHL 病の可能性、VHL 病と舌癌との関連を考察した。これら二つの研究成果から、*VHL* がん抑制遺伝子を含む 3p 欠失が舌扁平上皮癌にどのように関わるか､新たな遺伝子異常関与の可能性を提示する。

　次に本研究で用いられる代表的用語につき、簡潔に説明する。

①　がん抑制遺伝子とは

がんの発症を抑える遺伝子を指す。一般的に DNA の修復、細胞増殖の抑制やアポトーシスを導く機能をもつ遺伝子をがん抑制遺伝子とよんでいる。

②　*VHL* がん抑制遺伝子とは

von Hippel-Lindau (*VHL*)遺伝子は VHL 病の責任遺伝子で 3p25.3 に位置する [1, 2]。3 つのエクソンをもち、213 個のアミノ酸を指定している。VHL タンパク質の機能は、低酸素下で誘導される hypoxia-inducible factor (HIF) 1-alpha の分解を導くことにある [3]。HIF は vascular endothelial growth factor (VEGF) などを誘導し、血管新生をうながす。従って VHL タンパク質は主に血管新生の抑制に働く。また細胞周期制御にも関わっている [4]。VHL 病の臨床診断基準は次の通りである [5]。(1)中枢神経と網膜の血管芽腫を認める。(2)中枢神経か網膜の血管芽腫に加えて腎臓、膵臓、肝臓の多発嚢胞もしくは褐色細胞腫もしくは腎細胞癌を認める。(3)家族歴がある場合には上記関連病変のうち 1 病変以上を認める。

③　LOH（loss of heterozygosity）とは

対立遺伝子欠失をさす(Fig.1A)。がん細胞で生じる様々なタイプのDNA障害のなかで、本来1対ある対立遺伝子のうちの片側の対立遺伝子が消失していることを示す。LOHの検出は、対立遺伝子が互いに異なる場合でのみ検出可能であるため、対象DNA領域はヘテロ接合型を示す領域となる。本研究では、遺伝子多型部位や遺伝子変異部位を含む領域について、蛍光色素標識しながらPolymerase Chain Reaction (PCR)で増幅し、各対立遺伝子を区別、定量した。

④　マイクロサテライトとは

DNA上に広く散在する数塩基単位の反復配列である。CAリピートが有名で、反復回数に個人差があり、多型のバリエーションも多い。反復回数の差、すなわちPCR増幅断片の長さの違いで、2つの対立遺伝子が容易に識別できる利点がある。ここでは蛍光標識されたPCR増幅断片を電気泳動し、長さの違いで各対立遺伝子を区別、蛍光強度で各対立遺伝子量を定量した。

⑤　マイクロサテライト不安定性とは

同一個体内でマイクロサテライトの反復回数にばらつきがみられることで(Fig. 1B)、複製エラーを修復できない状況を示す。DNA複製の過程で誤った塩基が複製されると、このミスマッチを修復する機能が細胞にはある。マイクロサテライトは単純塩基反復配列のため、複製途中でDNA2本鎖の間でスリッページが起こることがあり、エラーを起こしやすい。ミスマッチ修復機能の喪失により、このスリッページしたミスマッチを修復できずそのまま維持されると、その後に分裂した細胞の反復回数が異なることになる。このようにミスマッチ修復機能の喪失は、マイクロサテライトで検出しやすい。高頻度にマイクロサテライト不安定性がみられる代表的な癌として、遺伝性非腺腫性大腸癌があげられる。

2. がん抑制遺伝子研究の歴史

がん抑制遺伝子の概念は1969年に報告されたHarris Hらが行った細胞融合実験に始まった。つまり癌細胞と正常細胞の融合細胞は、正常細胞の表現形質を

示すという結果であった[6]。これは正常細胞内に癌の表現形質を抑制するものの存在を示唆している。一方いくつかの遺伝性の癌で染色体の特定領域に高頻度に欠失がみられることからもその存在が想定された。1971 年に Knudson AG が網膜芽細胞腫について報告している[7]。網膜芽細胞腫は、散発性よりも遺伝性で両側性、早期に発症しやすい。この発症時期の統計学的推測から、その発症には少なくとも 2 つの遺伝子の変異で説明がつくと報告した。これが 2 ヒット説と呼ばれ、現在までその考え方は支持されている。1980 年代に入るとマイクロサテライトマーカーを用いた染色体の対立遺伝子欠失（LOH）部位の検出などの技術進歩の結果、がん抑制遺伝子のクローニングが可能となった。1986 年に *RB* 遺伝子がん抑制遺伝子ではじめてクローニングされた[8]。その後現在まで *p53* 遺伝子をはじめとした多くのがん抑制遺伝子が同定され、それぞれの機能も解明されつつある。また細胞の癌化は多くの場合、複数の異なった遺伝子変異の蓄積の結果発症する（多段階発癌）と考えられている。過去の文献では正常上皮から大腸癌発症に至るまでに、*APC* 遺伝子、*K-ras* 遺伝子、*DCC* 遺伝子、*p53* 遺伝子の変異が順次生じると報告されている[9]。一般的にがん抑制遺伝子ではその遺伝子機能の喪失によって細胞増殖や細胞周期の制御ができなくなり、細胞不死化や無秩序な細胞増殖につながる。本論文でふれている代表的ながん抑制遺伝子を表に挙げる（Table 1）。がん抑制遺伝子の解析が進み、DNA の欠失や塩基の変異が確認された。その一方で欠失や変異がないにもかかわらず遺伝子発現が強く抑えられているものも見つかった。1990 年代後半からメチル化による遺伝子発現の抑制を中心とした Epigenetics の研究が報告されている[10]。がん抑制遺伝子の失活機構の 1 つとして捉えられるようになった。2004 年にヒトゲノムの全貌が報告されると、一塩基多型 : Single Nucleotide Polymorphism (SNP)を指標とした全ゲノム関連解析が盛んとなり、がん感受性遺伝子が多数見つかってきている[11-13]。また次世代シーケンサ開発により、個々のがん細胞遺伝子変化がゲノムワイドで解読できるようになってきた[14, 15]。このような個別のがんゲノム解読や解析は、今後がんの個別化治療の発展に寄与していくと期

待されている[16]。

3．研究の目的

頭頸部癌は全癌の約５％を占めており、約 90%が扁平上皮癌である。国立がんセンターがん対策情報センターが公開しているがん情報サービス (http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/)によると、日本における 2001 年の口腔咽頭癌の罹患者数は 9612 人で全癌の 1.69%を占めた。口腔咽頭癌の５年生存率は約 50%で全癌の５年生存率とほぼ同等である。舌癌は口腔咽頭癌の中でも代表的な疾患と言える。一般的に舌癌は高齢者に多いが、他の頭頸部癌に比べて若年層での発症も多く散見される(http://seer.cancer.gov/)。飲酒、喫煙が癌発症の危険因子であるが、特に若年層では慢性の歯牙刺激や環境要因に加え、遺伝的背景の影響が考えられている[17]。舌癌に対する治療は放射線療法、化学療法、手術を単独もしくは組み合わせて行う。しかし、いずれも生理面、機能面（嚥下、構音、味覚、唾液分泌）で後遺症を生じる。仮に癌細胞だけアポトーシスに導くことができれば、治療の後遺症を限りなく少なくすることが可能と予想される。遺伝子治療や分子標的治療はその可能性を追求できる数少ない選択肢の一つである。舌癌の遺伝子変化を解明し、遺伝子治療や分子標的治療の発展に寄与することが研究の目的である。

口腔癌や頭頸部癌における遺伝子異常の解析では、染色体 3p（特に 3p14.2、3p21.3、3p24）、9p21、17p13 に LOH が多いとされている[18]。これらの部位には、がん抑制遺伝子が存在している。まず 9p21、17p13 にはそれぞれ *p16* 遺伝子、*p53* 遺伝子が存在しており、双方ともに口腔癌や頭頸部癌において約 50%の頻度で変異やメチル化などの遺伝子変化が報告されている[19, 20]。頭頸部癌培養細胞を用いて、これら *p53* 遺伝子、*p16* 遺伝子の機能喪失が細胞の不死化に関係していることも示されている[21]。一方、染色体 3p 上で LOH 頻度が高い部位がある。それらの近傍に位置する代表的ながん抑制遺伝子には、*Fragile histidine triad*（*FHIT*)遺伝子(3p14)、*MutL, E. coli, homologue of, 1*(*MLH1*)遺

伝子(3p21)、*Transforming Growth Factor Beta Type II Receptor*（*TGFBR2*）遺伝子(3p24)、*von Hippel-Lindau*（*VHL*)遺伝子(3p25)などが挙げられる[22-29]。しかし、直接これらの遺伝子の異常が2ヒット失活で証明されている報告は無い。一般に、LOHが多い場所の近傍には癌と関係の深いがん抑制遺伝子の存在が疑われる。本研究ではこの疑問を解明するべく、頭頸部癌の中でも舌癌に絞り、染色体3pの遺伝子変化に主眼をおいて検討を行った。

第Ⅱ章　舌扁平上皮癌における染色体 3p の遺伝子解析

1．序論

第Ⅰ章の研究の目的でも述べたが、染色体 3p 上のがん抑制遺伝子の異常の報告が多数ある。しかし、これまでの報告には問題点がいくつか挙げられる。まず、頭頸部扁平上皮癌を対象にしているものが多い点である。頭頸部領域は複数の臓器で構成されており、それぞれの臓器の遺伝子変化には異なる特徴がみられる[30]。従って頭頸部をひとくくりとして遺伝子異常を調査すると、各臓器の特徴をとらえにくい可能性がある。次に *VHL* 遺伝子の LOH はないと報告されているが、*VHL* 遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーである D3S1317 では高頻度に LOH が報告され、解離がみられる[28, 31]。そこで本研究では染色体 3p の遺伝子変化を次の２つの視点から再検討することにした。

(1)対象を舌癌に限定する。National Cancer Institute の Surveillance Epidemiology and End Results の癌統計（http://seer.cancer.gov/)によると、頭頸部癌のうち 2005 年から 2009 年に喉頭癌と診断されたのは 12360 人で舌癌の 12770 人とほぼ同数であった。また年齢調整発生率も喉頭癌が 10 万人対 3.4 人で、舌癌の 3.1 人と同等であった。このうち 20 歳以下、20-34 歳、35-44 歳の占める割合は喉頭癌が 0.0%、0.4%、2.7%であるのに対し、舌癌では 0.1%、1.9%、5.8%と喉頭癌に比べて若年層で診断される率が多い。日本でも舌癌は比較的若年での発症例が、他の頭頸部癌に比べて多く散見される。2010 年から 2012 年の 3 年間で、日本大学医学部付属板橋病院において診断、治療された舌癌と喉頭癌はそれぞれ 35 人と 87 人であった(Fig. 2)。喉頭癌の発症年齢は 50 歳以上 90 歳未満に分布しているのに対し、舌癌では 30 代後半および 40 代前半に各 1 人ずつ発症しており、舌癌で若年発症の傾向がみられた。また 40 歳未満の若年女性の舌癌は著明に再発が多く、より短期間で再発したとの報告がある[17]。このように舌癌の発症にはその他の頭頸部癌と異なる遺伝子背景や発症機転があると推測されるため、舌癌に限定して遺伝子変化を調査する意味があると考え

られる。

(2) *VHL* 遺伝子の LOH と変異解析を行う。以前の報告ではエクソン 1 上の遺伝子多型部位で Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)解析を行っている [28]。しかしこの方法では LOH の判定が定性的で欠失の検出に限界がある。また日本人では *VHL* 遺伝子上で最もヘテロ型頻度の高い SNP はエクソン 3 上にあるため、エクソン 1 上の遺伝子多型部位で LOH を評価しても評価可能症例が限られてしまう欠点がある。持田らは、*VHL* 遺伝子エクソン 3 上の SNP を用いて、定量的に欠失を判定する方法を確立している [32]。*VHL* 遺伝子の LOH を正確に検討し、同時に他の 3p 領域の欠失と比較し、欠失の相互関係を明らかにすることを試みた。

以上から、今回我々は舌扁平上皮癌に対象を絞り、舌癌に特徴的な *VHL* 遺伝子の異常、すなわち欠失に加え塩基配列異常が見いだされるかを検討した。また同時に他の 3p 領域の遺伝子欠失とどのように関連するかを検討した。

2．材料および方法

1）対象

対象は原発性舌扁平上皮癌患者 28 例である。男性 12 例、女性 16 例で平均年齢は 55.8 歳(22~81 歳)である。舌扁平上皮癌の臨床病理学的分類は cancer staging classification (6th edition) of the International Union Against Cancer (UICC) に基づき行った。stage Ⅰ は 7 例、stage Ⅱ は 16 例、stage Ⅲ は 2 例、stage Ⅳ は 3 例、grade 1 は 20 例、grade 2 は 7 例、grade 3 は 1 例である(Table 2)。この中に家族性発症 1 家系 2 例が含まれている。研究を行うにあたり全員からインフォームドコンセントを得た。

2）DNA 抽出

癌組織、非癌部組織を lysis buffer (50mM TrisHCl pH8.0 ; 0.1M NaCl ; 20mM EDTA pH8.0 ;1% SDS)中で 250μg/ml proteinase K にて 37℃一晩の定温放置で

組織溶解後、phenol/chloroform にて DNA を抽出した。非癌部組織が無い場合は血液から John SWM らの方法で DNA を抽出した[33]。

3) *VHL* 遺伝子の LOH 解析

持田らの方法に従って、*VHL*遺伝子エクソン3内のSNPの遺伝子型(SNPデータベース：rs1642742)を定量解析することにより、LOHを決定した[32] (Fig. 3)。Table 3にPCRプライマー配列とSNaPプライマー配列を示す。各0.3μMのPCRプライマー、100μMの4dNTP、2mMの$MgCl_2$、1単位のAmplitaq Gold (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)を含む反応溶液で100ngのサンプルDNAを用いてPCRを行った。DNA Thermal Cycler 9700 (PE- Applied Biosystems)を用いて、95℃5分の前加熱後、94℃30秒、50℃1分、72℃1分を35サイクル、最後に72℃7分の追加伸長反応を行った。増幅産物をマイクロコン100 (Amicon, Inc., Beverly, Mass.）にて精製した後、0.3pmolの増幅DNAと0.3pmolの*VHL* SNaPプライマーとSNaPshot ready reaction premix (PE- Applied Biosystems)を混合し、一塩基伸長反応を行った。一塩基伸長反応はDNA Thermal Cycler 9700 (PE- Applied Biosystems)を用いて、96℃10秒、50℃5秒、60℃30秒を25サイクル行った。一塩基伸長反応サンプルをSigma spin post-reaction clean-up column (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)にて精製後、ABI310 Genetic Analyzer (PE- Applied Biosystems)でSNPの遺伝子型を定性定量解析した。ヘテロ接合型AGの症例で各マーカーのピーク面積比を求め、癌部AG比が非癌部のAG比の60%未満をLOH陽性とした。

一方、同一SNPについてRFLP法によるLOH検索も行った[34]。前述のPCR産物200ngを、*Acc*Iにて37℃90分と55℃90分で制限酵素反応を行った。反応液を4% Nusieve agarose gelにて電気泳動した。対立遺伝子Aは110 bp、対立遺伝子Gは90 bpの断片を検出する(Fig. 4)。

4) マイクロサテライトマーカーの LOH とマイクロサテライト不安定性

解析

マイクロサテライトマーカーの forward primer に蛍光色素を標識し、reverse primer には tailed reverse primer (PE-Applied Biosystems) を使用し、PCR 後 ABI310 Genetic Analyzer (PE- Applied Biosystems)でフラグメント解析を行った。検索したマイクロサテライトマーカーと使用したプライマーを Table 3 に示す。各 0.67μM のプライマー、240μM の 4dNTP、2.5mM の $MgCl_2$、1.6U の Amplitaq Gold (PE- Applied Biosystems)を含む反応溶液で 60ng のサンプル DNA を用いて PCR を行った。95℃10 分の前加熱後、94℃15 秒、52-60℃15 秒、72℃30 秒を 24-30 サイクル、最後に 72℃40 分の追加伸長反応を行った。各領域の PCR アニーリング温度とサイクル数、および産物の長さを、Table 3 に示す。LOH の判定は各マーカーのピークの面積比を求め、癌部の値が非癌部の 66%以下を示したものを LOH 陽性とした。

5）塩基配列解析

以前に報告された方法に従って、３つの*VHL*遺伝子のエクソンおよびその周囲をPCRにて増幅した[35]。各0.3μMのプライマー、100μMの4dNTP、1単位の Amplitaq Gold (PE- Applied Biosystems)を含む反応溶液で100ngのサンプル DNAを用いてPCRを行った。エクソン1については、10% dimethyl sulfoxide 存在下にPCRを行った。用いたプライマー配列は、Table 3に示す。DNA Thermal Cycler 9700 (PE- Applied Biosystems)を用いて、95℃5分の前加熱後、95℃20秒、55℃2分、72℃2分を2サイクル、95℃30秒、60℃30秒、72℃1分を38サイクル、最後に72℃7分の追加伸長反応を行った。PCR産物をMicrocon 100 filter（Amicon, Inc. Beverly, Mass.）にて精製後、Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing kit (PE-Applied Biosystems)を用いて塩基配列解析反応を行った。ABI310 Genetic Analyzer (PE- Applied Biosystems)にて、塩基配列を決定した。

6）統計分析

全ての統計学的分析はSAS statistical software package (version 5.0; SAS institute, Cary, NC)を用いた。臨床病理学的組み合わせと染色体3pや*VHL*遺伝子のLOHの有無との比較は、Fisher exact probability testを用いて評価した。

3. 結果

1) *VHL*遺伝子の異常

*VHL*遺伝子のLOHは、エクソン3に存在するSNP (G or A)で決定した。28例中11例がヘテロ接合型でLOH解析が可能であった。そのうち5例 (45.5%)でLOHを認めた (Fig. 3)。4例が対立遺伝子Aの欠失であり、1例が対立遺伝子Gの欠失であった。制限酵素*Acc* Iを用いたRFLP法でも、この5症例の癌部で同一対立遺伝子のLOHが確認された(Fig. 4)。

癌部の*VHL*遺伝子塩基配列解析では、異常は認められなかった。症例No.52でイントロン1のスプライス供与部位近傍に点突然変異を認めたが、これは生殖細胞系列点突然変異であり、体細胞突然変異ではなかった。第III章でその詳細を述べる。

2) 染色体3pのLOH

*VHL*遺伝子での欠失と*VHL*遺伝子以外の染色体3pの遺伝子欠失が関連するかを知るために、染色体3p上のマイクロサテライトマーカーを使ってLOHを同時解析した。過去の報告から高頻度にLOHが報告されているマイクロサテライトマーカー3箇所ー*D3S1609, D3S1612, D3S1300*ーと*VHL*遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーー*D3S1317*—、更にマイクロサテライト不安定性でも使用される*AFM183yc3*を用いてLOHを調べた[21, 35, 36]。また陰性コントロールとして、染色体3p以外のマイクロサテライトマーカーについても検討した。Fig. 5にその結果の代表例を示す。Fig. 6に染色体3pのdeletion mapを染色体3p以外のものと比較してまとめた。*VHL*遺伝子と同様に高い欠失率を示したものはD3S1317 (40%)、D3S1609 (50%)、D3S1300(50%)であった。また3カ

所以上ヘテロ接合型でLOH解析可能であった19症例を見ると、1カ所でもLOHが観察された症例は12例（63.2%）で、そのうち複数カ所の片側対立遺伝子欠失が観察されたものは10例と高頻度であった（Fig. 7)。染色体3p以外のLOHと比較すると、染色体3pのLOHが明らかに高い頻度で起こっていることがわかる（Fig. 6)。

原発性舌扁平上皮癌28例の *VHL* 遺伝子と染色体3pのLOHについて、症例の背景因子との関連を調べた（Table 4)。40歳未満の若年者群で *VHL* 遺伝子のLOHが少ない傾向があった（p＝0.06 by Fisher's exact probability test)。40歳以上の高齢者群で *VHL* 遺伝子の欠失との関連の可能性が示唆された。

3)マイクロサテライト不安定性

症例No. 30 とNo.165は、娘と母である。この家族性舌癌発症例は、各世代での発症年齢が若年化し重症化する、表現促進の傾向がみられた。この1家系における臨床経過を下記に示す。祖母が89歳時に舌高分化扁平上皮癌を発症し、舌部分切除術を受けた。母も64歳時に舌高分化扁平上皮癌を発症し、舌部分切除術を受けた。娘は30歳時に舌高分化扁平上皮癌を発症した。初療時は3人ともにStage Ⅱであったが、娘は治療の甲斐なく亡くなった。3人の生活習慣は同様であった可能性は否定できないものの、生活の場は別々であった。このようにトリプレットリピート病のような表現促進現象がこの家族性舌癌症例にも疑われた。そこで、複製エラーが起こりやすい癌かどうかをまず調べた。遺伝性非腺腫性大腸癌のマイクロサテライト不安定性の評価に関する国際ガイドラインに基づき、5か所のマイクロサテライトマーカー―*AFM093xh3, BAT25, BAT26, APC, Mfd15CA*―について、複製エラーの有無を検討した[37]。家族性症例のNo 30, No 165も含め、全例の舌癌症例でマイクロサテライト不安定性は観察されなかった（Fig. 5B)。

4．考察

今回我々は *VHL* 遺伝子のエクソン 3 内にある SNP を用いて、舌癌の *VHL* 遺伝子の片側対立遺伝子欠失(LOH)を検索した結果、45.5%と高頻度に欠失が起こっていることを発見した。しかも p 値 0.06 と統計学的有意差はなかったが、40 歳未満の若年症例では *VHL* 遺伝子の LOH が少なく、高齢者症例に多い傾向があった。舌癌の発生や進展過程が、若年層と高齢層で異なる可能性が考えられた。*VHL* 遺伝子異常の検討については、頭頸部腫瘍で二報ある。一つは Waber, PG らの報告で、頭頸部扁平上皮癌 26 例を対象に調べている。このなかに舌癌症例がどのくらい含まれているか不明であるが、*VHL* 遺伝子の LOH や変異、メチル化を調べており、一例も異常はなかったと報告している [28]。彼らの LOH 検索は、*VHL* 遺伝子のエクソン 1 内の SNP を利用して SSCP 法と RFLP 法で検討している。26 症例中 18 例で検討可能であった。以上から Waber らの報告で *VHL* 遺伝子の LOH が認められなかった理由として､次の 2 点が挙げられる。１番目に対象症例が舌癌に限らず頭頸部の広範囲の扁平上皮癌だったため、LOH を抽出できなかった可能性がある。2 番目に *VHL* 遺伝子内でも我々が調べたエクソン 3 のように 3'端近傍で LOH を生じやすく､エクソン 1 は保たれやすい可能性が考えられた。もう一報は Partrige, M らの報告である。口腔扁平上皮癌 14 症例における *VHL* 遺伝子の塩基配列変異を検索しており、一塩基多型を 1 例に認めるだけで突然変異はない [29]。今回の我々の検討結果も、*VHL* 遺伝子の翻訳領域を調べる限り舌扁平上皮癌の体細胞突然変異症例はなく、過去の報告と矛盾しない結果であった。このように、舌扁平上皮癌に絞った解析は我々が初めてであり、*VHL* 遺伝子の LOH が高頻度に起こっていることが初めて証明された。しかしがん抑制遺伝子の 2 ヒット説に従う現象は、舌扁平上皮癌の *VHL* 遺伝子には観察されなかった。*VHL* 遺伝子の塩基配列変異が一例も見られなかったため、*VHL* 遺伝子の 2 ヒット失活を証明できた症例はない。*VHL* 遺伝子の異常が高頻度に観察される散発性腎細胞癌でも、*VHL* 遺伝子の 2 ヒット異常を証明できるのは 44%にすぎない。32%は 1 ヒットでそのほとんどが LOH である [35]。さらにそれら *VHL* 遺伝子が 1 ヒットの腎細胞癌でも、その下

流のVEGF転写の抑制が効かず、mRNAの過剰発現が起こっていた[38]。他の遺伝子についても、LOHがその遺伝子発現の抑制に寄与することが知られている[39]。以上のことから、*VHL*遺伝子のLOHもそれだけで、癌の進展に関与できると考えられ、舌癌もまたその標的臓器になっていると考えられた。今後はVHLタンパク質レベルの発現も調べ、片側欠失がどのような影響を与えるか検討することが重要と思われる。

今回、さらに*VHL*遺伝子を含めた6箇所で3pにおける対立遺伝子欠失を評価した。染色体3p以外では欠失頻度が0〜25%であるのに対し、染色体3pでは27.3%〜50%と高頻度であった。また欠失が染色体3pの広い範囲に及ぶ症例が大多数を占めた。頭頸部扁平上皮癌を対象とした報告では、染色体3p のLOHが高頻度に観察されている。たとえばD3S1609では47%、D3S1612では48%、がん抑制遺伝子*FHIT*のイントロン5内に位置しているD3S1300では32%である[22, 25]。口腔癌 を対象とした報告でも、D3S1300は63%や42%と報告されている[23, 40]。我々の検討でもD3S1300は50%であり、これらの報告とほぼ同じ結果と考えられる。舌扁平上皮癌では頭頸部扁平上皮癌と比べてD3S1612の欠失頻度が低く（舌扁平上皮癌27%：頭頸部扁平上皮癌48%)、D3S1300の欠失頻度が高い（舌扁平上皮癌50%：頭頸部扁平上皮癌32%）傾向があるかもしれない。今までの報告では舌癌発生に染色体3pのどこが重要なのかが不明であった。今回我々はこれらを同時に検討できたことにより、「1ヵ所というよりはむしろ染色体3pの複数カ所で、対立遺伝子欠失が同時におこっていることが重要である」可能性を示した。特に舌癌では*VHL*遺伝子を含めD3S1609(50%)やD3S1300 (50%)が特徴的といえる。D3S1609近傍には*TGFBR2*遺伝子、D3S1300は*FHIT*遺伝子イントロン5内に存在する。この他、D3S1612近傍には*TGFBR2*遺伝子や *hMLH1*遺伝子が存在する。これらがん抑制遺伝子のLOHや遺伝子発現量低下の報告があり、舌癌発生に関与する可能性がある[22, 23, 25, 41]。口腔の前癌病変では、染色体3pのLOHがあると癌化のリスクが高いと報告されている[42]。これは3pのLOHが癌の結果ではなく、癌発生進展の要因

として関与することを示唆する。

Comparative genomic hybridization(CGH)を用いた解析では、特徴的な遺伝子欠失部位を染色体全域に渡って同時解析できる。CGH を用いた人固形癌における染色体変化解析によると、染色体 3p の欠失頻度が最も高い癌の中に頭頸部扁平上皮癌が挙げられている[43]。また頭頸部扁平上皮癌の原発部位別で CGH 解析を行った結果では、口腔癌で染色体 3p の欠失が最も特徴的であった。しかも染色体 3p 欠失症例のうち 3p の全域に欠失の及ぶ症例が 2/3 以上を占めていた[30]。また口腔扁平上皮癌 14 例の array CGH 解析では、3p14 の広範囲にコピー数減少がみられた症例は、3p24 でも広範囲なコピー数減少がみられた[44]。これらの報告は我々と同様の結果を示している。なぜ 3p の複数座位で同時欠失することが、舌癌に高頻度に観察されるのか。舌癌の発癌の引き金には、染色体 3p を標的とした特別な欠失機構が働く可能性が考えられた。これらが解明できれば、遺伝子治療の標的の 1 つとなりうるであろう。本稿ではマイクロサテライト不安定性についても検討した。頭頸部扁平上皮癌 67 例を調べたところ、7%と低頻度であったという報告がある[24]。また頭頸部扁平上皮癌の多発腫瘍群と単発腫瘍群とで比較したところ、マイクロサテライト不安定性に差はなかった[24]。染色体 3p 上にあるミスマッチ修復酵素遺伝子 *hMLH1* について変異解析をしたが、異常は認められていない[25]。我々の舌扁平上皮癌の結果を含め、頭頸部扁平上皮癌発生にマイクロサテライト不安定性はほとんど関与しないものと考えられた。

以上より、舌癌発生には、染色体 3p の複数のがん抑制遺伝子の機能喪失が関連すると考えられる。今後、D3S1609 や D3S1300 の近傍のがん抑制遺伝子の同定と、*VHL* 遺伝子およびこれらのタンパク質レベルでの機能解析が舌癌発生機構を知る上で必要となるであろう。

第Ⅲ章　*VHL* がん抑制遺伝子の生殖細胞系列点突然変異を認めた舌扁平上皮癌の１症例について

1．序論

前章で述べたように舌扁平上皮癌症例における *VHL* がん抑制遺伝子の異常解析を行っている中、すでにスプライス供与部位の近傍で生殖細胞系列点突然変異が起こっている症例を見出した。この症例の舌癌組織では *VHL* 遺伝子の LOH も認めている。仮に点突然変異が原因でスプライシング異常が起こることになれば、この症例は変異 *VHL* 遺伝子をもっており VHL 病発症に関わることになる。その場合にはこの舌扁平上皮癌は VHL 病関連腫瘍の１つとなるという、新たな VHL 病の病態が示されることになる。本来 VHL 病(MIM# 193300)とは脳脊髄や網膜に血管芽腫を生じるほか、腎細胞癌、褐色細胞腫などを発症する。VHL 病は有病率が 36,000 人に１人といわれ、20%が散発性で 80%が家族性である[45, 46]。VHL 病家系では *VHL* 遺伝子の生殖細胞系列突然変異を有しており、その半分以上がミスセンス変異といわれている[35, 47]。また VHL 病で発生する腫瘍の２ヒット目は LOH が多い。従って多くの VHL 病の責任部位は *VHL* 遺伝子の翻訳領域であり、*VHL* 遺伝子のスプライシング異常の報告は非常に少ない。スプライス供与部位（イントロン-1 または+1)での点突然変異が観察された症例でも、実際に *VHL* 遺伝子のスプライシング異常による異常転写物を証明した報告は稀である。また現在まで VHL 病で発生する腫瘍として舌扁平上皮癌の報告はない。本研究では、今症例の舌扁平上皮癌が VHL 病関連腫瘍であるかという疑問を解明すべく、次の点について解析を行った。(1)第１ヒットとして変異対立遺伝子で *VHL* mRNA のスプライシング異常を起こしているのか。(2)第２ヒットとして舌扁平上皮癌部での *VHL* 対立遺伝子欠失(LOH)は、正常対立遺伝子の欠失であるのか。

2．対象および方法

1）対象症例

Table 2 の症例 No. 52 を対象とする。55 歳男性で、約 1 年来の舌の腫瘤を主訴に当科を来院した。喫煙暦は 20 本/日、35 年で飲酒歴は 2 合/日、35 年であった。胃潰瘍の既往がある。特記すべき家族歴はなかった。舌腫瘍の生検結果は高分化扁平上皮癌であった。舌癌 T2N0M0 の診断で根治手術を施行した。全身検査では胆のうポリープと右腎嚢胞を 2 つ認める以外に異常を認めなかった。その後現在まで 12 年間無病生存中である。

2）Total RNA 抽出とリアルタイム RT-PCR

癌部、非癌部組織を Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)にて溶解後、取扱説明書に従って total RNA を抽出した。DNase I 処理の後、2 μg の total RNA から random primer 50 pmol と 5 単位の AMV reverse transcriptase version 2.2 (Life Sciences, Florida, FL)を用いて cDNA を合成した。ABI7000 (Applied Biosystems)を用いて、95°C15 秒、60°C60 秒を 40 サイクルの SYBR Green PCR (Applied Biosystems)を行った。使用したプライマーを Table 5 に示す。コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 遺伝子を使用した。PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動しフラグメントサイズを計測した。各々のフラグメントサイズはイントロン PCR が 167bp、エクソン PCR が 144bp である。

なお、DNA 抽出、*VHL* 遺伝子の LOH 解析、塩基配列解析については、第Ⅱ章の 2. 材料および方法で述べた。LOH 解析 SNaPshot に用いた PCR プライマー配列と SNaP プライマー配列を Table 5 に示す。

3．結果

症例 No. 52 では癌部および末梢血の DNA ともに、片側対立遺伝子の c.340+5G>C の点突然変異を認めた（Fig.8)。この変異はスプライス部位近傍にあるため、スプライシング異常を生じる可能性があった。スプライシング異常の有無を調べるため、癌部より total RNA を抽出し *VHL* 遺伝子 mRNA をリア

ルタイム RT-PCR 法で調べた（Fig.9)。症例 No. 52 では正常にスプライシングを受けた 144 bp の正常転写産物に加えて、167bp の異常転写産物が検出された(Fig.9C)。半定量的検索で異常転写産物の量は、正常転写産物の約 1.5%と著しく少なかった(Fig.9B)。*VHL* 遺伝子 mRNA から作製した cDNA を塩基配列解析したところ、c.340+5G>C の点突然変異に加えてイントロン配列が観察された(Fig.10)。

さらに *VHL* 遺伝子の LOH を検討した。既に前章にもあるように、症例 No. 52 では *VHL* 遺伝子のエクソン 3 における LOH が観察されている（Fig.6)。Fig.11 に持田らの方法を用いて検討した結果を示す [32]。SNP の遺伝子型定量から、癌部で片側対立遺伝子 A が欠失していることがわかる。ここではさらに突然変異部位イントロン 1 において、どちら側の片側対立遺伝子が欠失しているのかを検討した。Fig.11 に示すように、点突然変異対立遺伝子 C 側の欠失であることがわかった。

以上より c.340+5G>C の点突然変異を認め、スプライシング異常を生じていることを証明した。さらに癌部では *VHL* 遺伝子の LOH を認めたが、変異対立遺伝子が欠失しており正常対立遺伝子が残存していた。

4．考察

今症例は、*VHL* 遺伝子のイントロン 1 のスプライス供与部位近傍にあたる IVS1+5G>C の生殖細胞系列点突然変異をもつ症例であった。*VHL* 遺伝子 mRNA の RT-PCR 解析ではスプライシングをうけていない異常転写産物が検出された。さらに *VHL* 遺伝子 mRNA の塩基配列解析でイントロン 1 の配列が確認された。イントロン 1 の 5 番目の塩基置換であるが、スプライシングに異常をきたす重要な機能部位であることがはじめて示された。スプライシングをうけない転写産物からは、35 アミノ酸という短いペプチドが翻訳され停止コドンとなるため、VHL タンパク質としては機能しない産物が合成されると予想される。

一般にエクソン-イントロン連結部のコンセンサス配列は 5’-$A_{(64\%)}$ $G_{(73\%)}$ / $G_{(100\%)}$ $T_{(100\%)}$ $A_{(62\%)}$ $A_{(68\%)}$ $G_{(84\%)}$ $T_{(63\%)}$ -3’である。ここで（　）内の％は、その部位での塩基の出現頻度を示す。この配列は、スプライシングの第 1 段階で U1 snRNA (3’-UCCAUUCAUApppGm-5’）が結合する時に認識される重要な配列である。U1 snRNA と 5’スプライス部位の相補性の限界は 4-6 塩基といわれている。*VHL* 遺伝子のエクソン 1-イントロン 1 連結部の場合 5’-AG/GTACGG-3’であり、イントロン 1+4 と+6 の 2 塩基（下線）が U1snRNA とミスマッチである。従って *VHL* 遺伝子では U1snRNA が結合してスプライシングを始める上で、イントロン 1+5 の G 塩基が重要と考えられる。従って、今回のようなこの部位の塩基置換がスプライシング異常をきたすことになったと推測される。

それでは、このような *VHL* 遺伝子イントロン 1 の 5’スプライス部位の異常で VHL 病が報告されているであろうか？調べる限り VHL 病で 11 例の報告がある (Table 6) [48-54]。これら 11 例は分子レベルでは同じ異常をきたすため、*VHL* 遺伝子イントロン 1 のスプライシング異常は確かに VHL 病の 1 つの責任部位と言える。しかし、今症例では同様のスプライシング異常があるにも関わらず VHL 病の臨床診断基準を満たしていない [5]。また VHL 病の家族歴もない。これらの原因として 2 つの可能性が考えられる。ひとつは VHL 病をまだ発症していない可能性がある。しかし今症例は現在 62 歳であるが、舌癌以外は何の VHL 病の臨床病態も示していない。VHL 病の平均発症年齢は 26 歳で、65 歳までに 97%が発症する [55]。また我々が調べた限り VHL 病で舌癌を発症した報告はなかった。今症例は VHL 病を発症しない可能性の方が強いかもしれない。もうひとつは IVS1+5 点突然変異では発症しない可能性である。まれではあるが、VHL 病家系の未発症キャリア例の報告がある [56]。今まで発症例が遺伝子解析対象になっても、未発症例が遺伝子解析対象になることはほとんど無かった。従って、*VHL* 遺伝子異常があっても発症しない場合がどのぐらいの頻度であるかは不明である。2 ヒット目が標的組織に起こらない限り VHL 病発症には至らないと考えれば、今症例のように未発症症例はある確率で見出されて当然と考えられる。

もう1つの疑問は、舌扁平上皮癌がVHL病関連腫瘍といえるのであろうか。今症例の癌組織では生殖細胞系列点突然変異に加えLOHが認められ、一見すると *VHL* 遺伝子の2ヒット症例にみえる。しかし実際には2ヒット目のLOHは突然変異対立遺伝子の欠失で、正常対立遺伝子は依然として保存されている癌であった。従って、舌癌はVHL病関連腫瘍ではなかったと言える。このように、点突然変異部位で欠失の有無を証明しなければ、がん抑制遺伝子の2ヒット失活を正しく評価することはできない。今まで数多くの癌でがん抑制遺伝子の2ヒットが示されているが、今回のような解析方法でがん抑制遺伝子の2ヒットを再度評価し直す必要があるかもしれない。

以上のように、*VHL* 遺伝子スプライス供与部位の生殖細胞系列点突然変異をもつ舌扁平上皮癌症例を経験した。*VHL* 遺伝子のスプライシングにおいては、U1snRNAがコンセンサス配列を認識するうえでIVS+5が重要であることが判明した。また一見して *VHL* 遺伝子の2ヒット失活を生じている舌癌に見えたが、実際には1ヒットであったことが判明した。従って舌癌はVHL病関連腫瘍とは言えないことが示された。VHL病未発症キャリアの存在も示し得たと思われる。このように多彩な新知見をみいだすことができた貴重な1症例と言える。

第Ⅳ章．結語

舌扁平上皮癌における染色体 3p の遺伝子異常について検討した。舌癌において高頻度に *VHL* 遺伝子の LOH が認められた。染色体 3p の広範囲な片側対立遺伝子欠失が舌癌発症に関与することが推測された。1 例で *VHL* 遺伝子のイントロン 1 スプライス供与部位近傍の点突然変異がみられ、スプライシング異常が確認された。この症例では *VHL* 遺伝子の LOH も認められたが、突然変異対立遺伝子の欠失であったため結果的に 1 ヒット症例であった。従って舌癌は VHL 病関連腫瘍ではなかった。

Ｖ.図表

Table 1　Tumor suppressor genes described in this article

Gene	Locus	Hereditary tumor	Sporadic tumor	Function	OMIM
FHIT	3p14	腎癌？	食道癌、胃癌、大腸癌	DNA 複製制御、ストレス反応	601153
MLH1	3p21	遺伝性非腺腫大腸癌	大腸癌、子宮体癌	DNA ミスマッチ修復	120436
TGFBR2	3p24	遺伝性非腺腫大腸癌	胃癌	細胞分裂誘起反応	190182
VHL	3p25	von Hippel-Lindau 病	腎癌、血管芽腫など	転写制御、低酸素反応制御	608537
APC	5q21	家族性大腸腺腫	大腸癌、胃癌など	細胞骨格	611731
p16	9p21	悪性黒色腫	悪性黒色腫、膵癌	細胞周期制御	600160
RB1	13q14	網膜芽細胞腫	骨肉腫、肺癌など	細胞周期制御、転写制御	614041
p53	17p13	Li-Fraumeni 症候群	大部分の悪性腫瘍	細胞死制御、細胞周期制御	191170

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.

Table 2 Clinical features of 28 cases of tongue squamous cell carcinoma

Case	Age	Sex	Smoking	Alcohol	Stage	Grade
20	22	M	-	-	II	1
21	25	M	+	+	II	1
30	30	F	-	-	II	1
31	30	F	+	-	II	1
33	32	M	-	-	IV	1
34	34	M	+	-	II	1
35	35	F	-	-	I	1
36	38	F	+	+	I	1
37	39	M	+	+	I	2
51	54	F			II	1
52	55	M	+	+	II	1
53	56	F	-	-	II	1
160	61	F	-	-	II	2
161	61	M	+	+	II	2
162	62	F	-	-	I	1
164	63	F	-	-	IV	2
165	64	F	+	-	II	1
166	64	F	-	-	IV	1
167	69	M	-	+	III	2
168	66	M	-	+	I	1
170	72	F	-	-	I	1
171	73	M	+	+	II	2
172	73	F	+	+	II	1
173	76	M	+	+	I	1
174	76	F	-	-	III	3
176	79	F	-	-	II	1
177	79	M			II	1
178	81	F	-	-	II	2

Table 3　Primer sequences used in this chapter

Gene	Locus	Dye	Forward (5'-3') Reverse (5'-3')	PCR	bp
VHL, LOH	Ex3	(PCR)	ctgcccattagagaagtattt aattcccactgaattaggtata	50℃, 35 cycles	110
		(SNap)	agtcaggacagcttgtatgtaaggaggttt	50℃, 25 cycles	
D3S1317	3p25	FAM	tacaagttcagtggagaacc cctccaggccatacacagtca	60℃, 24 cycles	169-179
D3S1609	3p23	VIC	tgctctacactgtggcttaatg atatccgtgggcaaatgg	60℃, 24 cycles	254-262
D3S1612	3p22	NED	tcttttagtcagcagttatgtc cccattaagaaatgttactctac	60℃, 24 cycles	211-217
D3S1300	3p14	FAM	agctcacattctagtcagcct gccaattccccagatg	55℃, 27 cycles	206-244
AFM183yc3	3p24	NED	ggcagtaccacctgtagaaatg gagtaacagaggcatcgtgtattc	59℃, 30 cycles	152-166
AFM093xh3	2p16	VIC	aaacaggatgcctgccttttta ggactttccacctatgggac	59℃, 30 cycles	210-232
BAT25	4q12	FAM	tcgcctccaagaatgtaagt tctgcattttaactatggctc	59℃, 30 cycles	127-129
BAT26	2p	VIC	tgactacttttgacttcagcc aaccattcaacatttttaaccc	55℃, 24 cycles	122-125
APC	5q21	NED	actcactctagtgataaatcg agcagataagacagtattactagtt	55℃, 24 cycles	116-148
Mfd15CA	17q11	FAM	ggaagaatcaaatagacaat gctggccatatatatatttaaacc	52℃, 24 cycles	150-166
VHL, *sequence*	Ex1	(PCR)	aagaagacggcggggaggag ggcttcagaccgtgctatcg	60℃, 38 cycles	320
	Ex2	(PCR)	ctcccaaagtgctgggatta gattggataccgtgcctgac	60℃, 38 cycles	325
	Ex3	(PCR)	agtctgtcactgaggatttg ctgagatgaaacagtgtaag	60℃, 38 cycles	250

Table 4　Comparison of clinical features of tumors with and without LOH at 3p or *VHL* alone

Feature		LOH of 3p (*VHL*) +	LOH of 3p (*VHL*) -	*P*
Age	<40	1 (0)	4 (4)	0.180
	≥40	10 (5)	9 (2)	(0.061)
Sex	Male	5 (2)	5 (3)	
	Female	6 (3)	9 (3)	
Smoking	+	5 (2)	3 (1)	
	-	4 (2)	10 (4)	
Alcohol	+	5 (2)	3 (0)	
	-	4 (2)	11 (5)	
Stage	Ⅰ	1 (0)	4 (2)	
	Ⅱ	9 (4)	6 (3)	
	Ⅲ	0 (0)	2 (0)	
	Ⅳ	1 (1)	2 (1)	
Grade	1	9 (4)	9 (6)	
	2	2 (1)	4 (0)	
	3	0 (0)	1 (0)	

LOH, loss of heterozygosity; VHL, von Hippel-Lindau gene;
UICC, International Union Against Cancer.
The numbers in parentheses indicate those with LOH of the *VHL* gene alone.

Table 5　Primer sequences used in this chapter

Region (Comment)	Primer	Forward (5'-3') / Reverse (5'-3')	bp
VHL	E1/I1F	CACAGCTACCGAGGTACCG	167
Ex1-In1	I1R	GAATGCTCTGACGCTTACGA	
VHL	1/2F	AGCTACCGAGGTCACCTTTG	144
Ex1/Ex2	2/3R	CAGAGTATACACTGGCAGTG	
GAPDH		GGTCGGAGTCAACGGATTTG	231
		GCATCTCGCTCCTGGAAGAT	
VHL		AAGAAGACGGCGGGGAGGAG	320
In1		GGCTTCAGACCGTGCTATCG	
(LOH)	SNaP	GCCGCATCCACAGCTACCGAGGTAC	
VHL		CTGCCCATTAGAGAAGTATTT	110
Ex3		AATTCCCACTGAATTAGGTATA	
(LOH)	SNaP	AGTCAGGACAGCTTGTATGTAAGGAGGTTT	

Ex, exon; In, intron.

Table 6　VHL diseases with mutations at the splice site of *VHL* gene

No.	Site	Mutation	VHL disease	Reference
1	IVS1+1	G>A	Type 1	Glasker S[46]
2	IVS1+1	G>A	Type 2B	Olshwang S[44]
3	IVS1-1	C>T	Type 1	Olshwang S[44]
4	IVS1-1	C>G	Type 1	Olshwang S[44]
5	IVS	ins GGT	Type 1	Stolle C[45]
6	IVS1+1	del5	Type 1	Olshwang S[44]
7	IVS1+5	G>C	Type 1	Zbar B[43]
8	IVS1+5	G>C	Type 1	Stolle C[45]
9	IVS1+5	G>C	Type 1	Maher ER[42]
10	IVS1+5	G>C	Type 1	Zhou J[48]
11	IVS1+5	G>C	Type 1	Erlic Z[47]

VHL, von Hippel-Lindau; IVS, intervening sequence.
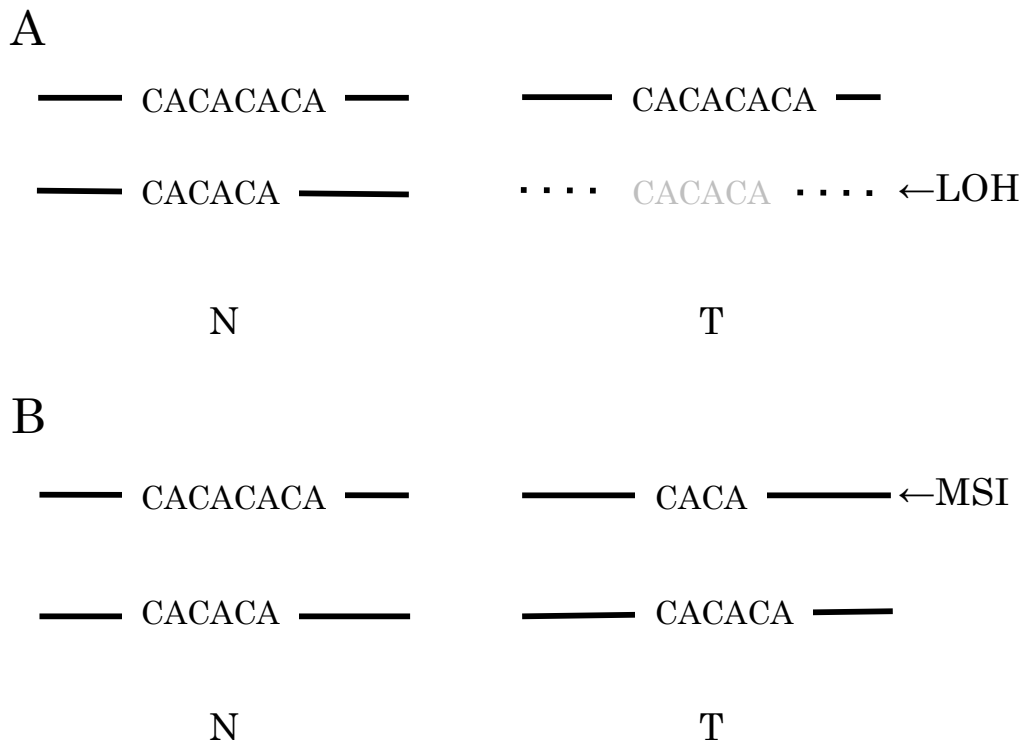
Figure 1. Schematic diagram of LOH (A) and MSI (B). N, non-tumor; T, tumor; LOH, loss of heterozygosity; MSI, microsatellite instability.
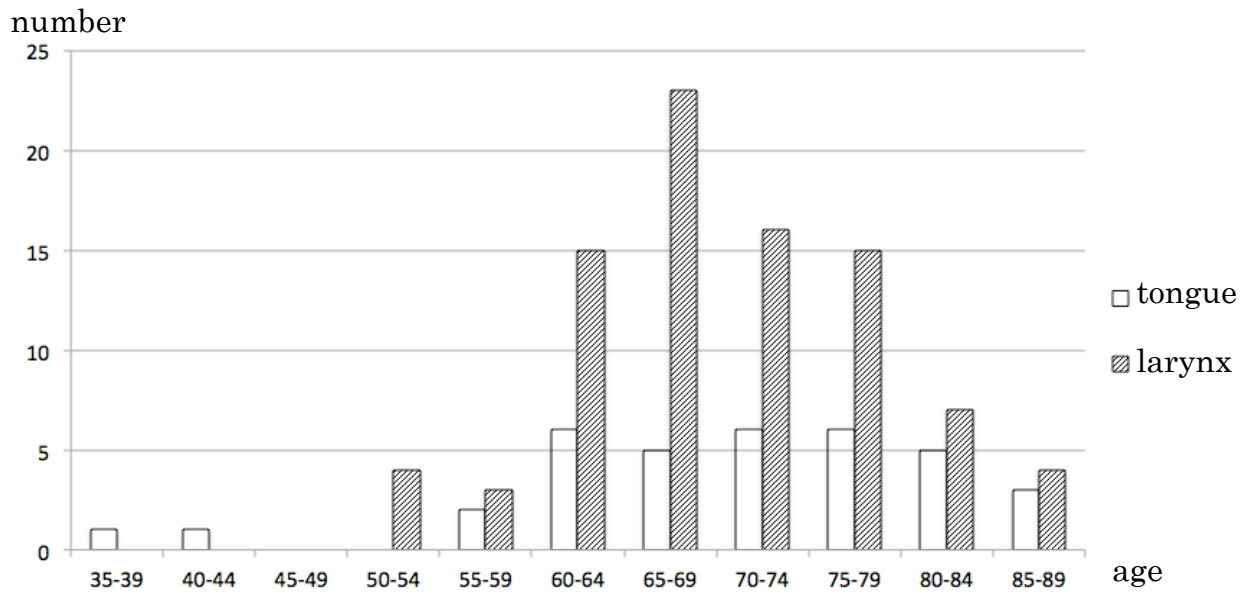
Figure 2. The age structure at diagnosis for cancer of the tongue and the larynx in Nihon University Itabashi Hospital between 2010 and 2012. The total case number of tongue cancer and laryngeal cancer is 35 and 87.
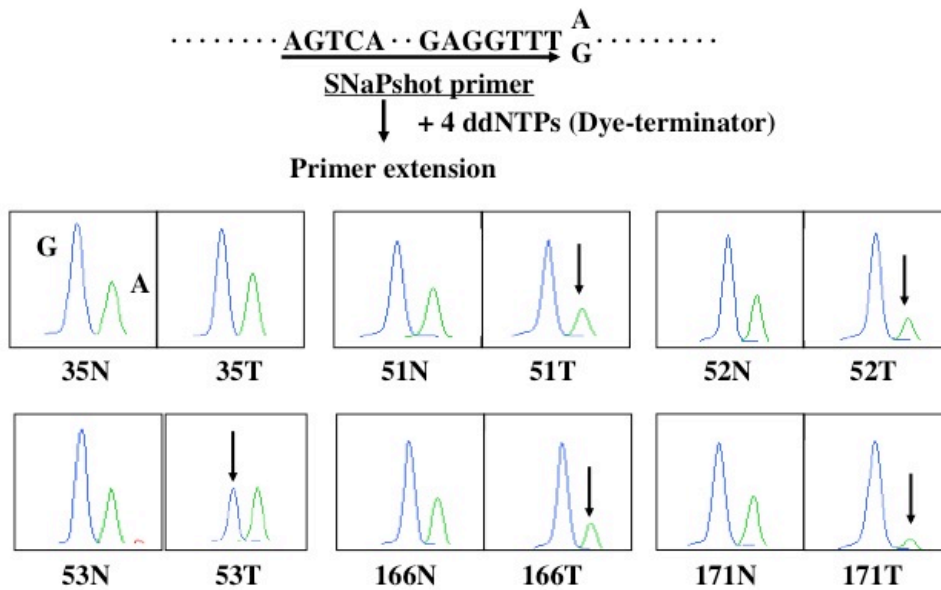
Figure 3. Analysis of LOH of the *VHL* gene. We performed quantitative primer extension analysis using dye terminators at the A-to-G SNP at position c.1008 in the *VHL* gene. Arrows indicate reduced signals in the primer extension analysis due to LOH at this particular locus. Case No. 35 did not show LOH at *VHL* and is shown as a control. N, non-tumor; T, tumor. The left peak indicates the G allele, and the right peak corresponds to the A allele. LOH, loss of heterozygosity; VHL, von Hippel-Lindau.
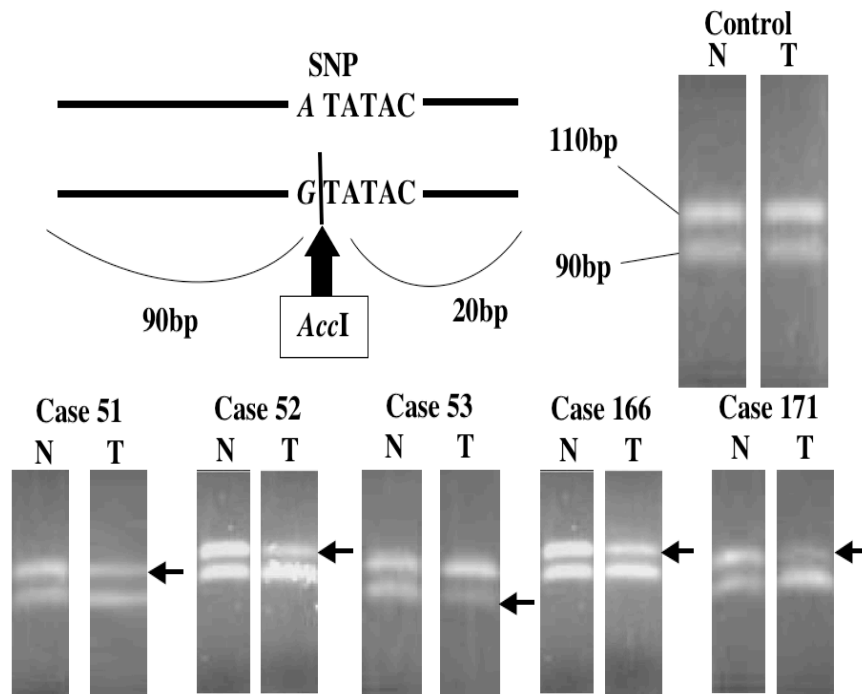
Figure 4. RFLP analysis of LOH in the *VHL* gene in samples of tongue squamous cell carcinoma. DNA sequences around the A-to-G SNP at position c.1008 in the *VHL* were amplified by PCR, and the PCR products were digested with the restriction enzyme AccI and subjected to electrophoresis through a 2% NuSieve / 1% agarose gel. Arrows indicate PCR fragments whose abundance was decreased in DNA isolated from tumor tissues compared to DNA isolated from normal tissue. N, non-tumor; T, tumor; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; LOH, loss of heterozygosity; VHL, von Hippel-Lindau.
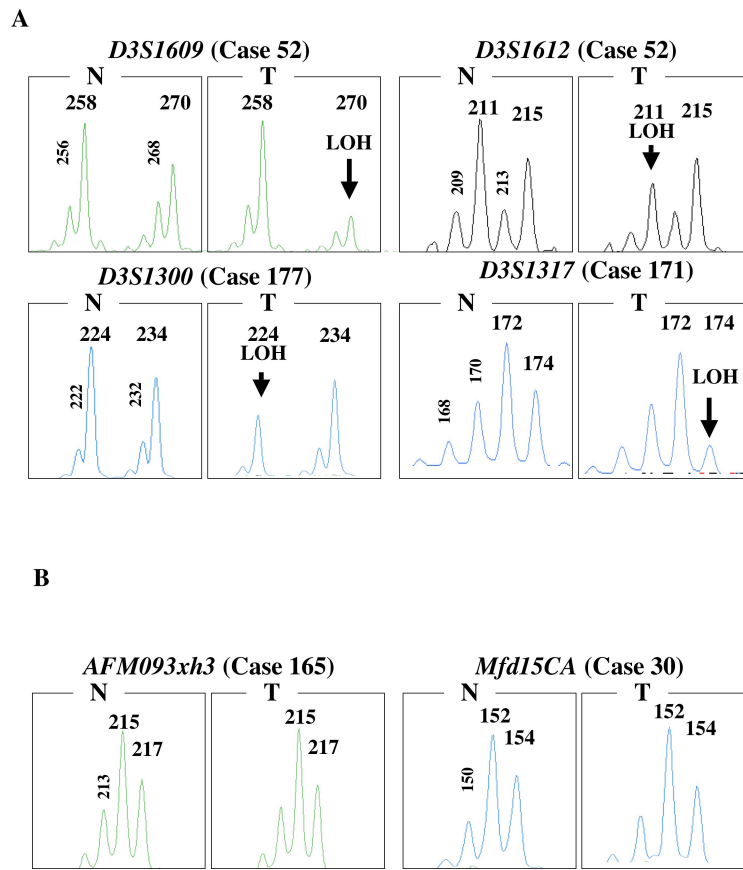
Figure 5. LOH (A) and microsatellite instability (MSI) (B) analyses of microsatellites using PCR with fluorescent primers. Numbers in the graphs indicate the number of base pairs of the amplified allelic fragments. (A) D3S1317, 172/174; D3S1612, 211/215; D3S1609, 258/270; D3S1300, 224/234. Arrows indicate deletions in tumor tissues. (B) AFM093xh3, 215/217; Mfd15CA, 152/154. N, non-tumor; T, tumor; LOH, loss of heterozygosity.
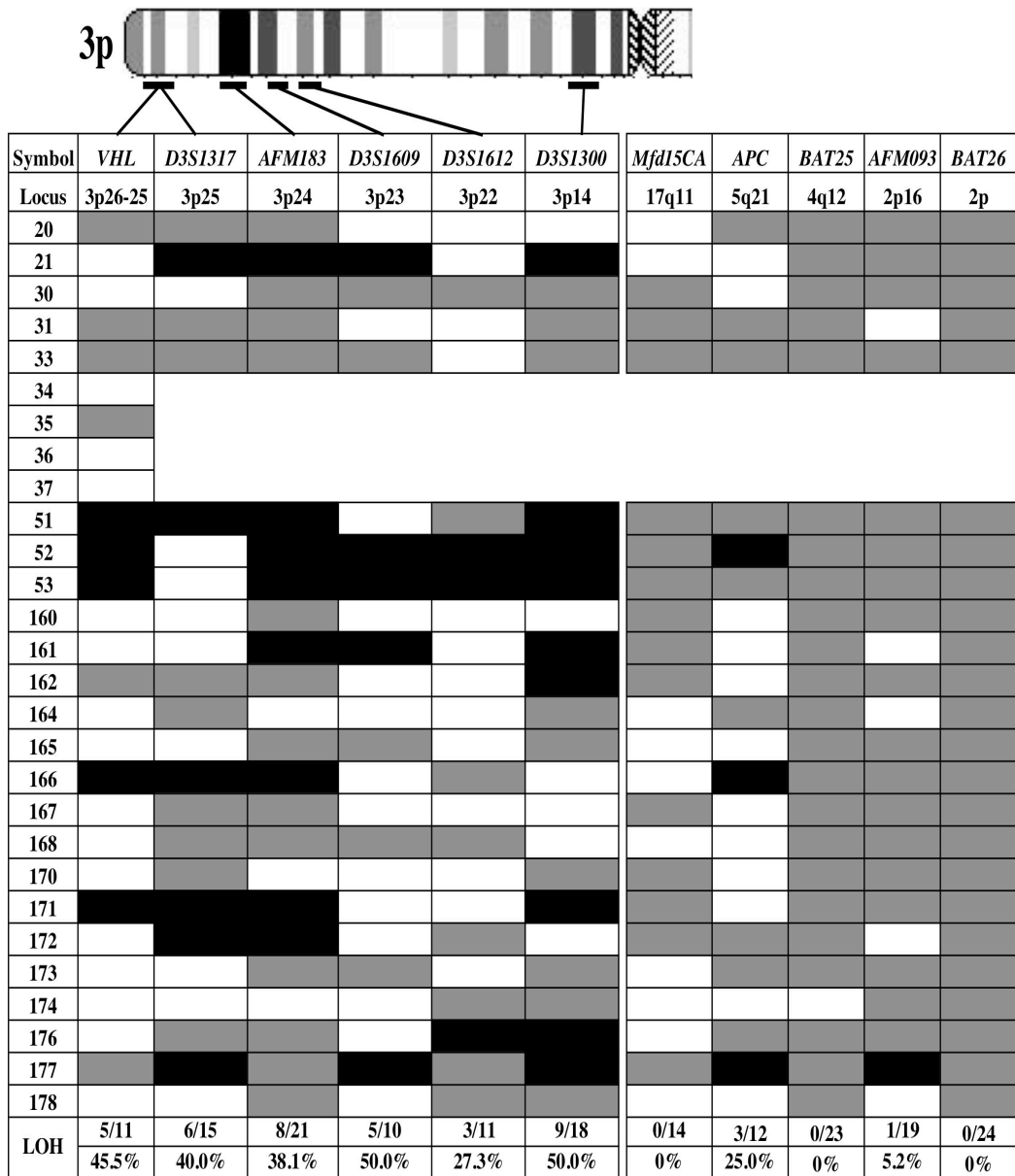
Figure 6. Deletion map of 3p in tongue cancer. Closed boxes, LOH; gray box, retention of heterozygosity; open box, not informative. Due to limitations in the sample specimens from cases 34 to 37, LOH analysis was restricted to the *VHL* gene in these patients. LOH, loss of heterozygosity.
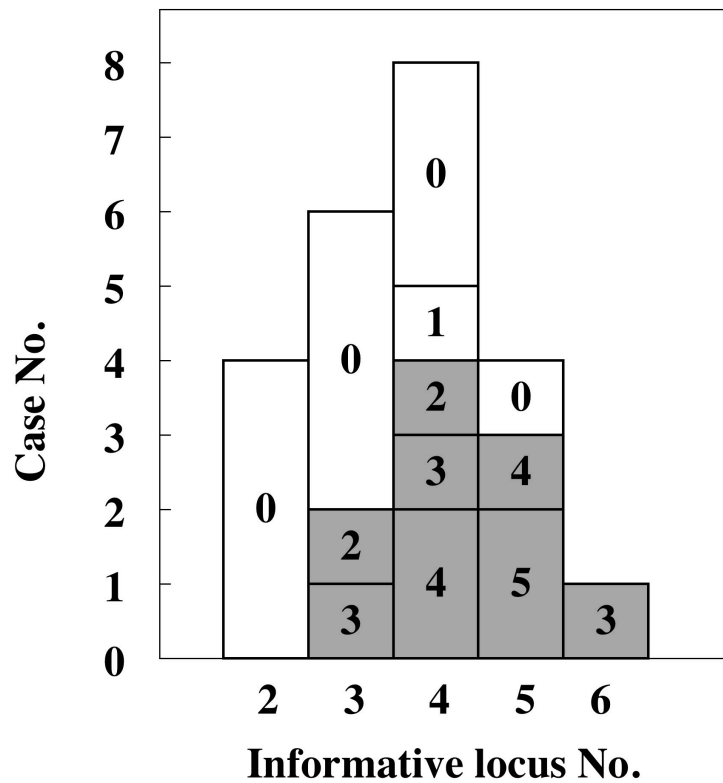
Figure 7. Frequency of simultaneous LOH at multiple microsatellite markers of 3p. The 6 loci of 3p that were investigated were categorized by the number of informative loci and, further, by the number of loci with LOH in the 23 cases that were informative at more than one locus on 3p. The numbers in the bar graph indicate the number of loci with LOH. The 19 cases showing more than one LOH and more than two informative loci are shown in gray. LOH, loss of heterozygosity.

Figure 8. Sequence profiles of exon 1 to intron 1 of the *VHL* gene. We compared DNA sequence from the cancerous tissue (A) and the peripheral blood (B) of the SCC patient to those of a control patient (C). The DNA from the peripheral blood of the patient was also sequenced in the reverse direction (D). VHL, von Hippel-Lindau.
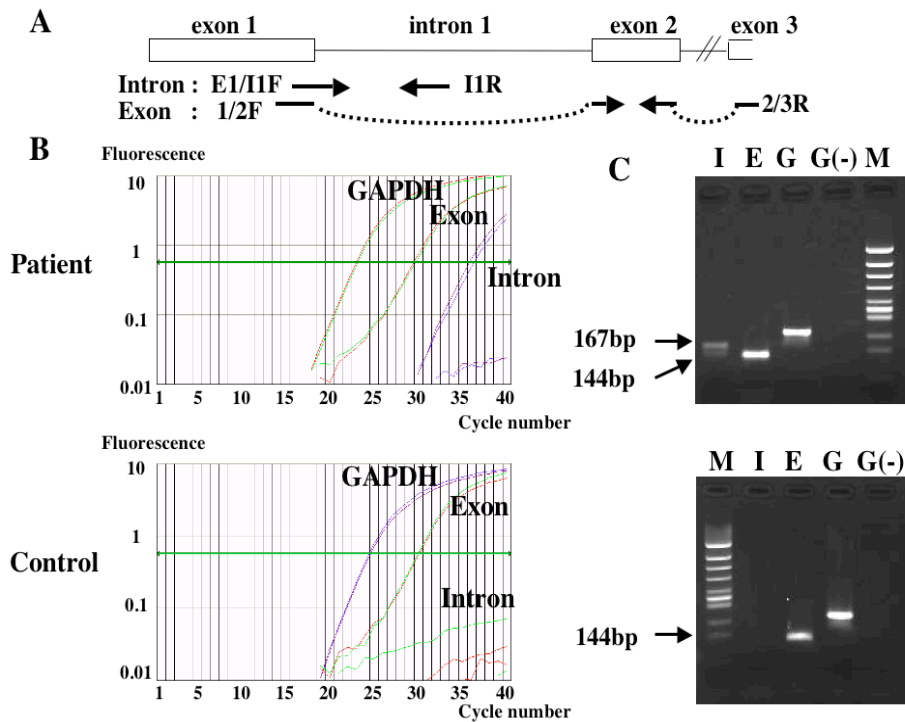
Figure 9. RT-PCR cripts. (A) Primer positions of intron and exon PCR. E1/I1F, 5'-CACAGCTACCGAGGTACCG-3'; I1R, 5'-GAATGCTCTGACGCTTACGA-3'; 1/2F, 5'-AGCTACCGAGGTCACCTTTG-3'; 2/3R, 5'-CAGAGTATACACTGGCAGTG-3'. (B) Amplification plots of real-time PCR. We performed real-time PCR for cDNA from the cancerous tongue tissue from the patient and cDNA from non-cancerous tissue of the control. *GAPDH* mRNA was quantified as an internal control. (C) Agarose gel electrophoresis of real-time PCR products. The PCR product obtained from (B) was run on a 2% agarose gel for electrophoresis. Lane I, intron PCR (167 bp); lane E, exon PCR (144 bp); lane G, *GAPDH* PCR; lane G (-), *GAPDH* PCR using DNase-treated RNA without reverse transcription as a template; lane M, *Hinc*II digests of ϕx174 phage DNA. *GAPDH*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
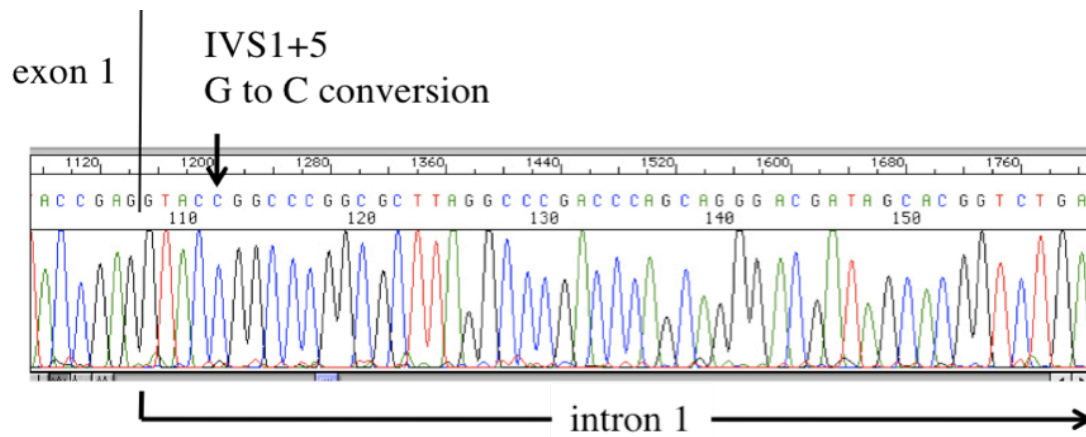
Figure 10. Sequence profile of the intron transcript. The sequence contained the mutated intron sequence.
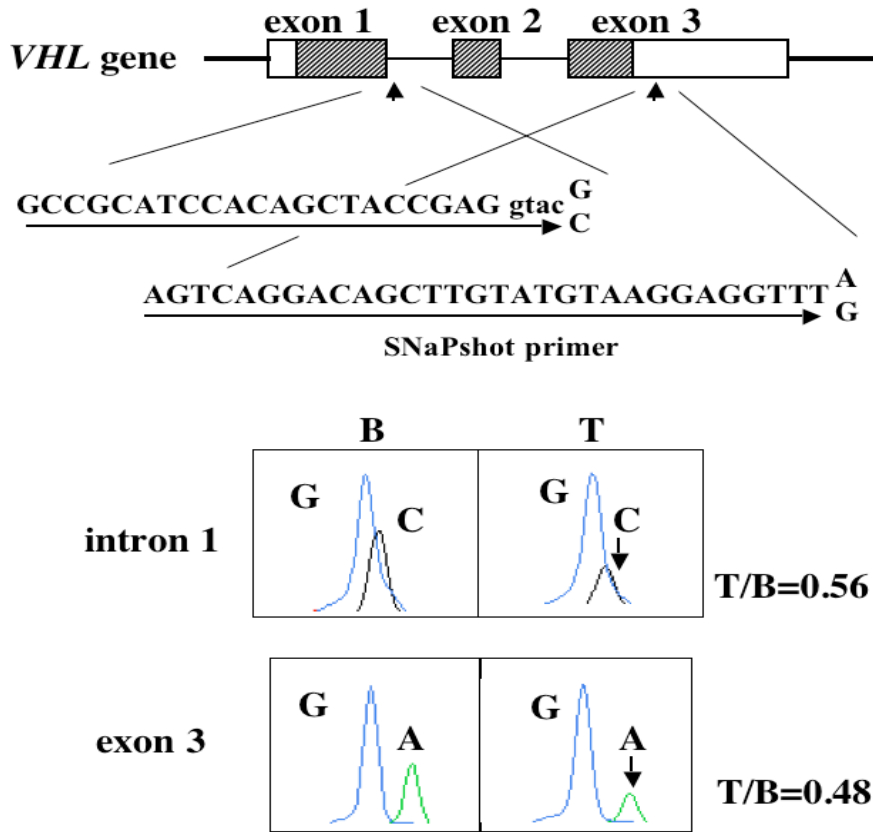
Figure 11. LOH of the *VHL* gene. LOH was analyzed at the heterozygous point mutation G/C of the intron 1 splice donor site and at the SNP A/G of the exon 3 of the *VHL* gene using a quantitative genotyping method. Comparison of cancerous tissue (T) and the peripheral blood (B) of the SCC patient indicated that the cancerous tissue had lost the mutant C allele (arrow) and the SNP A allele (arrow). LOH, loss of heterozygosity; VHL, von Hippel-Lindau; SCC, squamous cell carcinoma.

Ⅵ. 引用文献

1. Crossey PA, Foster K, Richards FM, et al. Molecular genetic investigations of the mechanism of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease: analysis of allele loss in VHL tumours. Hum Genet 1994;93(1): 53-8.
2. Latif F, Tory K, Gnarra J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science 1993;260(5112): 1317-20.
3. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 1999;399(6733): 271-5.
4. Pause A, Lee S, Lonergan KM, Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(3): 993-8.
5. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. Lancet 2003;361(9374): 2059-67.
6. Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. Nature 1969;223(5204): 363-8.
7. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 1971;68(4): 820-3.
8. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 1986;323(6089): 643-6.
9. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends Genet 1993;9(4): 138-41.
10. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. Cell 2007;128(4): 635-8.
11. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 2004;431(7011): 931-45.
12. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. Nature 2011;470(7333): 187-97.
13. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. Science 2011;331(6024): 1553-8.
14. Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. Sci Transl Med 2010;2(20): 20ra14.
15. McDermott U, Downing JR, Stratton MR. Genomics and the continuum of cancer care. N Engl J Med 2011;364(4): 340-50.
16. Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. Nat Med 2011;17(3): 297-303.
17. Vargas H, Pitman KT, Johnson JT, Galati LT. More aggressive behavior

of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. Laryngoscope 2000;110(10 Pt 1): 1623-6.
18. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. Oral Oncol 2000;36(5): 404-13.
19. El-Naggar AK, Lai S, Clayman G, et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. Am J Pathol 1997;151(6): 1767-74.
20. Nagai MA, Miracca EC, Yamamoto L, et al. TP53 genetic alterations in head-and-neck carcinomas from Brazil. Int J Cancer 1998;76(1): 13-8.
21. Loughran O, Clark LJ, Bond J, et al. Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. Oncogene 1997;14(16): 1955-64.
22. Gonzalez MV, Pello MF, Ablanedo P, Suarez C, Alvarez V, Coto E. Chromosome 3p loss of heterozygosity and mutation analysis of the FHIT and beta-cat genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Pathol 1998;51(7): 520-4.
23. Pateromichelakis S, Lee G, Langdon JD, Partridge M. The FHIT gene in oral squamous cell carcinoma: allelic imbalance is frequent but cDNA aberrations are uncommon. Oral Oncol 2000;36(2): 180-8.
24. Piccinin S, Gasparotto D, Vukosavljevic T, et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena. Br J Cancer 1998;78(9): 1147-51.
25. Nunn J, Nagini S, Risk JM, et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol 2003;39(2): 115-29.
26. Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF, Reiss M. Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. Cancer Res 1995;55(18): 3982-7.
27. Eisma RJ, Spiro JD, von Biberstein SE, Lindquist R, Kreutzer DL. Decreased expression of transforming growth factor beta receptors on head and neck squamous cell carcinoma tumor cells. Am J Surg 1996;172(6): 641-5.
28. Waber PG, Lee NK, Nisen PD. Frequent allelic loss at chromosome arm 3p is distinct from genetic alterations of the Von-Hippel Lindau tumor suppressor gene in head and neck cancer. Oncogene 1996;12(2): 365-9.
29. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, Phillips E, Langdon J. Location of candidate tumour suppressor gene loci at chromosomes 3p, 8p and 9p for oral squamous cell carcinomas. Int J Cancer 1999;83(3):

318-25.
30. Huang Q, Yu GP, McCormick SA, et al. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. Genes Chromosomes Cancer 2002;34(2): 224-33.
31. Li X, Lee NK, Ye YW, et al. Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. J Natl Cancer Inst 1994;86(20): 1524-9.
32. Mochida J, Esumi M, Kitajima A, Okada K. Allelic loss analysis of tumor suppressor genes regardless of heterozygosity: von Hippel-Lindau gene loss in renal cell carcinoma. J Urol 2008;180(2): 724-8.
33. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. Nucleic Acids Res 1991;19(2): 408.
34. Chino K, Esumi M, Ishida H, Okada K. Characteristic loss of heterozygosity in chromosome 3P and low frequency of replication errors in sporadic renal cell carcinoma. J Urol 1999;162(2): 614-8.
35. Hamano K, Esumi M, Igarashi H, et al. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. J Urol 2002;167(2 Pt 1): 713-7.
36. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. Cancer Res 1997;57(21): 4749-56.
37. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998;58(22): 5248-57.
38. Igarashi H, Esumi M, Ishida H, Okada K. Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. Cancer 2002;95(1): 47-53.
39. Yan DW, Fan JW, Yu ZH, et al. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. Biochim Biophys Acta 2012;1822(6): 918-26.
40. Ishwad CS, Ferrell RE, Rossie KN, et al. Loss of heterozygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. Int J Cancer 1996;69(1): 1-4.
41. Wang D, Song H, Evans JA, Lang JC, Schuller DE, Weghorst CM. Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type

II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. Carcinogenesis 1997;18(11): 2285-90.
42. Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. Oral Oncol 2009;45(8): 647-53.
43. Gebhart E. Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. Cytogenet Genome Res 2004;104(1-4): 352-8.
44. Garnis C, Campbell J, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. OCGR array: an oral cancer genomic regional array for comparative genomic hybridization analysis. Oral Oncol 2004;40(5): 511-9.
45. Maher ER, Iselius L, Yates JR, et al. Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. J Med Genet 1991;28(7): 443-7.
46. Yoshida M, Ashida S, Kondo K, et al. Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disease in Japan: an extended study of 77 families. Jpn J Cancer Res 2000;91(2): 204-12.
47. Gallou C, Joly D, Mejean A, et al. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. Hum Mutat 1999;13(6): 464-75.
48. Maher ER, Webster AR, Richards FM, et al. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. J Med Genet 1996;33(4): 328-32.
49. Zbar B, Kishida T, Chen F, et al. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. Hum Mutat 1996;8(4): 348-57.
50. Olschwang S, Richard S, Boisson C, et al. Germline mutation profile of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. Hum Mutat 1998;12(6): 424-30.
51. Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Hum Mutat 1998;12(6): 417-23.
52. Glasker S, Bender BU, Apel TW, et al. The impact of molecular genetic analysis of the VHL gene in patients with haemangioblastomas of the central nervous system. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999;67(6): 758-62.
53. Erlic Z, Hoffmann MM, Sullivan M, et al. Pathogenicity of DNA variants and double mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and von Hippel-Lindau syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2010;95(1): 308-13.
54. Zhou J, Wang J, Li N, et al. Molecularly genetic analysis of von Hippel-Lindau associated central nervous system hemangioblastoma.

Pathol Int 2010;60(6): 452-8.
55. Maher ER, Yates JR, Harries R, et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. Q J Med 1990;77(283): 1151-63.
56. Davies DR, Norman AM, Whitehouse RW, Evans DG. Non-expression of von Hippel-Lindau phenotype in an obligate gene carrier. Clin Genet 1994;45(2): 104-6.

研　究　業　績

浅　川　剛　志

Ⅰ	発表	①一般発表	85（単　24/共　61）
		②特別発表	1（単　0/共　1）
Ⅱ	論文	①原著論文	7（単　3/共　4）
		②症例報告	10（単　3/共　7）
		③総説	なし
Ⅲ	著書		なし

以上

Ⅰ発表
①一般発表
1. 生井明浩、池田　稔、工藤逸大、安田　皓、松永英子、浅川剛志、冨田　寛：味覚障患者に対する Polaprezinc の効果, 第 10 回日本口腔咽頭科学会, 千葉, 1997 年 9 月

2. 渡辺佳治、齋藤雄一郎、吉田晋也、弘重哉子、浅川剛志、木田亮紀、五十嵐眞：虫下部に限局した小脳腫瘍の 1 症例, 第 56 回日本平衡神経科学会, 松本, 1997 年 10 月

3. 浅川剛志、久松健一、亀谷隆一、勝又淳子、牧山　清、島崎奈保子、岡崎健二、小山和彦：鼻アレルギー患者の血清ヒスタミンおよび血小板活性化因子の分解酵素活性の検討, 第 37 回日本鼻科学会, 福井, 1998 年 10 月

4. 牧山　清、榎本知恵、島崎奈保子、浅川剛志、木田亮紀 、澤島政行 ： 内転型痙攣性発声障害例の臨床的検討, 第 50 回日本気管食道科学会, 神戸, 1998 年 11 月

5. 島崎奈保子、牧山　清、浅川剛志、亀谷隆一、木田亮紀 、澤島政行、竹之内玲子:喉頭麻痺例における声帯内方移動術例の検討, 第 50 回日本気管食道科学会, 神戸, 1998 年 11 月

6. 生井明浩、池田　稔、吉川琢磨、工藤逸大、浅川剛志、木田亮紀：味覚障害に対する亜鉛以外の補助療法について, 第 100 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 仙台, 1999 年 5 月

7. 浅川剛志、吉田晋也、吉川琢磨、渡辺直人：当科における頸部リンパ節生検の検討, 第 145 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会, 東京, 2001 年 7 月

8. 吉川琢磨、吉田晋也、浅川剛志：当科における甲状腺穿刺吸引細胞診の検討, 第 145 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会, 東京, 2001 年 7 月

9. 浅川剛志、吉田晋也、吉川琢磨、岸田覚：化学療法に抵抗した鼻腔形質細胞腫の 2 症例, 第 147 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会, 東京, 2001 年 10 月

10. 岸田　覚、吉田晋也、吉川琢磨、浅川剛志：著しい語音明瞭度低下をきたした大腸癌中脳転移の 1 症例, 第 147 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会, 東京, 2001 年 10 月

11. 岸田　覚、吉田晋也、吉川琢磨、浅川剛志：急性中耳炎に続発した感音性難聴の 2 症例，第 149 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会,東京,2002 年 3 月

12. 浅川剛志、木田亮紀、遠藤壮平、鴫原俊太郎：喉頭肉芽腫の検討，第 7 回板橋区医師会医学会,東京,2002 年 9 月

13. 浅川剛志、木田亮紀、遠藤壮平、小川　益、松山一夫、浅野友規美：副咽頭間隙血管腫の 2 症例，第 13 回日本頭頸部外科学会,仙台,2003 年 1 月

14. 吉田憲司、遠藤壮平、浅川剛志、小見山彩子、木田亮紀、佐々木健司、竹内正樹：脳膿瘍で発症した前頭骨骨腫の 1 例，第 15 回日本頭蓋底外科学会,東京,2003 年 6 月

15. 浅川剛志、遠藤壮平、野村泰之、小川益、山口威、松山一夫、朴理沙、児玉ひとみ、熊谷正樹、木田亮紀：家族性に発症した舌癌症例，第 16 回日本口腔咽頭科学会,東京,2003 年 9 月

16. 遠藤壮平、松崎洋海、松山一夫、丹羽秀夫、浅川剛志、吉澤由美、木田亮紀：シスプラチン耐性頭頸部腫瘍に対する遺伝子治療の試み，第 62 回日本癌学会,名古屋,2003 年 9 月

17. 浅川剛志、北島彰子、持田淳一、江角真理子：舌扁平上皮癌における VHL 遺伝子の変異解析，第 26 回日本分子生物学会,神戸,2003 年 12 月

18. 浅川剛志、遠藤壮平、辻　賢三、松山一夫、平井良治、岸田　覚、柴　和孝、木田亮紀：内視鏡的に摘出し得た鼻副鼻腔乳頭腫の 2 例，第 14 回日本頭頸部外科学会総会,東京,2004 年 1 月

19. 遠藤壮平、松崎洋海、松山一夫、丹羽秀夫、浅川剛志、工藤逸大、木田亮紀：シスプラチン耐性頭頸部腫瘍に対する遺伝子治療の試み，第 105 回日本耳鼻咽喉科学会,広島,2004 年 5 月

20. 浅川剛志、遠藤壮平、木田亮紀：舌扁平上皮癌における VHL 遺伝子変異解析，第 105 回日本耳鼻咽喉科学会,広島,2004 年 5 月

21. Endo S, Kida A, Suzuki S, Tsuji K, Niwa H, Kudo I, Asakawa T, Matsuzaki H, Saito T, TanakaY: Concurrent Chemoradiotherapy for Advanced Hypopharyngeal Cancer, 6th International Conference on Head and Neck Cancer, Washington,D.C.,2004 年 8 月

22. 遠藤壮平、松崎洋海、工藤逸大、浅川剛志、松山一夫、木田亮紀：Microarrayによる口腔扁平上皮癌発生に関与する遺伝子の検索，第17回日本口腔咽頭科学会,神戸,2004年9月

23. 遠藤壮平、江角真理子、松崎洋海、工藤逸大、浅川剛志、松山一夫、木田亮紀：Microarrayによる口腔扁平上皮癌発現に関与する遺伝子の検索，第63回日本癌学会,博多,2004年9月

24. 工藤逸大、浅川剛志、遠藤壮平、木田亮紀、石橋真理子、江角真理子：上顎癌におけるシスプラチン抵抗性関連遺伝子の発現解析，第63回日本癌学会,博多,2004年9月

25. 浅川剛志、江角真理子、遠藤壮平、木田亮紀：舌扁平上皮癌における染色体3ｐの遺伝子異常に関する検討，第63回日本癌学会,博多,2004年9月

26. 浅川剛志、江角真理子：スプライシング異常を生じたVHL遺伝子スプライス供与部位点突然変異はpathogenicか?，第27回日本分子生物学会,神戸,2004年12月

27. 浅川剛志、遠藤壮平、木田亮紀：舌扁平上皮癌におけるVHL遺伝子変異解析，第106回日本耳鼻咽喉科学会総会,大阪,2005年5月

28. 工藤逸大、浅川剛志、遠藤壮平、木田亮紀、石橋真理子、江角真理子：Gene chipによる上顎癌遺伝子発現の解析：p53変異や治療予後に関連する遺伝子の同定，第106回日本耳鼻咽喉科学会総会,大阪,2005年5月

29. 浅川剛志、木田亮紀、丹羽秀夫、野村泰之、辻　賢三、鈴木　伸：下顎骨aneurysmal bone cystの1症例，第18回日本口腔咽頭科学会総会,旭川,2005年9月

30. 浅川剛志、江角真理子、遠藤壮平、木田亮紀：マイクロアレイCGH法による家族性舌癌の遺伝子コピー数異常の解析，第64回日本癌学会学術総会,札幌,2005年9月

31. 工藤逸大、遠藤壮平、浅川剛志、江角真理子：p53の突然変異の有無による上顎発現遺伝子の違いについて，第64回日本癌学会学術総会,札幌,2005年9月

32. 浅川剛志、木田亮紀、小林大輔、関根大喜：喉頭癌（T3,T4）における動注化学療法，第15回城北、埼玉南部耳鼻咽喉科学術集会,東京,2006年3月

33. Asakawa T, Endo S, Nomura Y, Kishida S, Noguchi Y, Kida A, Ikui M : Intra-arterial chemoradiation: our method, The International Workshop on Intra-arterial Chemotherapy for Head and Neck Cancer, Springfield (Chicago), USA, 2006 年 8 月

34. 高根智之、浅川剛志、野村泰之、池田　稔、木田亮紀：口腔内より進展した鼻前庭放線菌症の一例，第 19 回日本口腔咽頭科学会, 東京, 2006 年 9 月

35. 飯國芙沙子、山口　威、浅川剛志、松山一夫、池田　稔、木田亮紀：振子様扁桃を呈した中咽頭癌の 1 例，第 19 回日本口腔咽頭科学会, 東京, 2006 年 9 月

36. 鴫原俊太郎、野村泰之、齋藤雄一郎、野口雄五、浅川剛志、平井良治、辻　賢三、池田 稔：良聴耳に対するステロイド鼓室内注入療法，第 51 回日本聴覚医学会総会, 山形, 2006 年 9 月

37. 野村泰之、野口雄五、浅川剛志、平井良治、増田　毅、安孫子　譲、鴫原俊太郎、齋藤雄一郎、池田　稔：メニエール病に対するキシロカイン鼓室内注入療法の聴力変動について，第 51 回日本聴覚医学会総会, 山形, 2006 年 9 月

38. 浅川剛志：当科における動注化学放射線療法，第 16 回城北、埼玉南部耳鼻咽喉科学術集会, 東京, 2006 年 9 月

39. 鴫原俊太郎、野村泰之、工藤逸大、浅川剛志、平井良治、岸田　覚、飯國芙沙子、辻　賢三、池田　稔：中耳真珠腫症術後における経過観察上の問題点について，第 16 回日本耳科学会総会, 青森, 2006 年 10 月

40. 野村泰之、鴫原俊太郎、浅川剛志、小野田恵子、齋藤雄一郎、末野康平、池田　稔：ホームビデオフレンツェル眼鏡によるめまい診療，第 16 回日本耳科学会総会, 青森, 2006 年 10 月

41. 浅川剛志、鴫原俊太郎、吉田憲司、野村泰之、松﨑洋海、岸田　覚、渡辺直人、田中真琴、高根智之、池田　稔：頭頸部癌動注化学療法後に生じた回転性眩暈の 2 例，第 16 回日本耳科学会総会, 青森, 2006 年 10 月

42. 浅川剛志、遠藤壮平、吉田憲司、野口雄五、山口　威、工藤逸大、岸田　覚、野村泰之、鴫原俊太郎、池田　稔、木田亮紀、田中良明、齋藤　勉、前林俊也：頭頸部癌に対する動注化学療法，第 472 回日本医学会例会, 東京, 2006 年 11 月

43. 松﨑洋海、浅川剛志、岸田　覚、濱田奈緒子、高根智之、野口雄五、池田　稔、

村松　高、古市基彦、大森一光、前田哲代：深頸部・縦隔膿瘍の一症例，第472 回日本医学会例会, 東京, 2006 年 11 月

44. 浅川剛志：若年性鼻咽腔血管線維腫症の 1 例，第 17 回城北、埼玉南部耳鼻咽喉科学術集会, 東京, 2007 年 3 月

45. 浅川剛志、野口雄五、工藤逸大、松山一夫、松﨑洋海、岸田　覚、矢田修一郎、児玉ひとみ、濱田奈緒子、高根智之、池田　稔：当科における耳科腺癌の検討，第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 金沢, 2007 年 5 月

46. 松﨑洋海、平井良治、浅川剛志、野口雄五、野村泰之、鴫原俊太郎、池田　稔：当科における平成 15, 16 年めまい入院症例の検討，第 69 回耳鼻咽喉科臨床学会総会, 東京, 2007 年 7 月

47. 高根智之、田中真琴、浅川剛志、野口雄五、野村泰之、鴫原俊太郎、池田　稔：上顎洞に発生した小細胞性神経内分泌癌の 1 例，第 69 回耳鼻咽喉科臨床学会総会, 東京, 2007 年 7 月

48. 野村泰之、平井良治、増田　毅、亀井千春、浅川剛志、鴫原俊太郎、池田　稔：急性感音難聴を呈した低髄液圧症候群の一例，第 52 回聴覚医学会総会, 名古屋, 2007 年 10 月

49. 平井良治、鴫原俊太郎、野村泰之、齋藤雄一郎、浅川剛志、野口雄五、増田　毅、亀井千春、池田　稔：当科におけるステロイド鼓室内注入療法，第 52 回聴覚医学会総会, 名古屋, 2007 年 10 月

50. 正木稔子、鴫原俊太郎、野村泰之、松山一夫、浅川剛志、池田篤生、樋口雄將、池田　稔、福島国道、角　光一郎：耳性脳腫瘍の一例，第 17 回日本耳科学会総会, 福岡, 2007 年 10 月

51. 鴫原俊太郎、野村泰之、野口雄五、浅川剛志、平井良治、増田　毅、濱田奈緒子、池田　稔、藤井元彰：聴神経腫瘍定位放射線治療後の耳科的検査所見の変化，第 17 回日本耳科学会総会, 福岡, 2007 年 10 月

52. 野村泰之、平井良治、松山一夫、浅川剛志、鴫原俊太郎、池田　稔：中耳奇形・伝音性難聴をともなったトレチャーコリンズ症候群の 1 症例，第 17 回日本耳科学会総会, 福岡, 2007 年 10 月

53. 池田篤生、平井良治、野口雄五、浅川剛志、野村泰之、児玉ひとみ、濱田奈緒子、正木稔子、池田　稔：転移性喉頭腫瘍の 1 例，第 59 回日本気管食道科

学会, 前橋, 2007 年 11 月

54. 野口雄五、鳴原俊太郎、柴　和孝、平井良治、浅川剛志、池田　稔：鼻背部に出現した侵襲性線維腫症例，第 18 回日本頭頸部外科学会総会, 京都, 2008 年 1 月

55. 平井良治、野村泰之、鴫原俊太郎、野口雄五、浅川剛志、松山一夫、池田　稔：顔面神経鞘腫と思われた側頭骨髄膜脳瘤症例，第 18 回日本頭頸部外科学会総会, 京都, 2008 年 1 月

56. 野口雄五、浅川剛志、平井良治、松山一夫、池田　稔：再発の診断に難渋した超選択的動注化学放射線療法後の喉頭癌症例，第 20 回日本喉頭科学会, 佐賀市, 2008 年 3 月

57. 野村泰之、岸　博行、松﨑洋海、戸井輝夫、浅川剛志、鴫原俊太郎、池田　稔：めまい入院症例の検討，第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 大阪, 2008 年 5 月

58. 野口雄五、浅川剛志、平井良治、松山一夫、吉田憲司、池田　稔：進行喉頭癌（T3，T4）に対する超選択的動注化学療法の検討，第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 大阪, 2008 年 5 月

59. 池田篤生、平井良治、浅川剛志、濱田奈緒子、野口雄五、野村泰之、鴫原俊太郎、池田　稔、工藤逸大：尋常天疱瘡により口腔・咽頭粘膜疹を認めた 2 例，第 70 回耳鼻咽喉科臨床学会, 長崎, 2008 年 6 月

60. 戸井輝夫、鴫原俊太郎、浅川剛志、岸　博行、柴　和孝、野村泰之、松山一夫、池田　稔：めまいを主訴とした多発性硬化症症例，第 70 回耳鼻咽喉科臨床学会, 長崎, 2008 年 6 月

61. 樋口雄將、浅川剛志、平井良治、濱田奈緒子、正木稔子、木田　渉、池田　稔：オトガイ部に発生した類皮嚢胞の一例，第 21 回日本口腔咽頭科学会, 鹿児島, 2008 年 9 月

62. 鴫原俊太郎、野村泰之、浅川剛志、平井良治、増田　毅、濱田奈緒子、亀井千春、池田　稔：グリセオール試験試行症例の経過について，第 53 回日本聴覚医学会総会, 東京, 2008 年 10 月

63. 鴫原俊太郎、野村泰之、辻　賢三、野口雄五、浅川剛志、平井良治、増田　毅、濱田奈緒子、正木稔子、池田　稔：聴神経腫瘍の聴力悪化時における治療の効果，第 18 回日本耳科学会, 神戸, 2008 年 10 月

64. 田中真琴、鴫原俊太郎、増田　毅、平井良治、浅川剛志、野口雄五、野村泰之、池田　稔：鼓膜穿孔閉鎖における接着法の問題点, 第 19 回日本頭頸部外科学会総会, 名古屋, 2009 年 1 月

65. 古阪　徹、野口雄五、浅川剛志、関根大喜、松﨑洋海、樋口雄將、池田篤生、平井良治、矢田修一郎、木田　涉、小泉紋禎、岡崎健二、岡崎美佐子、木島太郎、寺田俊昌、雨宮啓之、飯塚直樹、奥田雪雄、木田亮紀、池田　稔：喉頭扁平上皮癌声門型 T2N0M0 に対する CBDCA 同時放射線併用療法, 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 東京, 2009 年 5 月

66. 鴫原俊太郎、田中真琴、岸　博行、浅野友規美、増田　毅、関根大喜、松﨑洋海、浅川剛志、野口雄五、野村泰之、池田　稔：聴神経腫瘍の聴力変化について, 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 東京, 2009 年 5 月

67. 鴫原俊太郎、増田　毅、平井良治、浅川剛志、野村泰之、池田　稔：めまい・難聴症例の小脳橋角部腫瘍の合併頻度, 第 18 回日本聴神経腫瘍研究会, 東京, 2009 年 6 月

68. 古阪　徹、鴫原俊太郎、野村泰之、辻　賢三、野口雄五、工藤逸大、浅川剛志、松﨑洋海、関根大喜、浅野友規美、田中真琴、池田　稔：舌癌における超選択的動注化学療法と放射線同時併用療法について, 第 22 回日本口腔咽頭科学会総会, 和歌山, 2009 年 10 月

69. 鴫原俊太郎、野村泰之、辻　賢三、野口雄五、浅川剛志、平井良治、増田　毅、田中真琴、池田　稔：MRI による聴神経腫瘍の発見頻度, 第 19 回日本耳科学会総会, 東京, 2009 年 10 月

70. 鴫原俊太郎、浅川奈緒子、増田　毅、平井良治、浅川剛志、野口雄五、野村泰之、亀井千春、池田　稔：純音聴力正常域の超神経腫瘍症例の経過, 第 54 回日本聴覚医学会総会, 東京, 2009 年 10 月

71. 池田篤生、浅野友規美、関根大喜、浅川剛志、池田　稔：眼窩骨膜下膿瘍の 1 例, 第 493 回日大医学会例会, 東京, 2009 年 11 月

72. 古阪　徹、野口雄五、浅川剛志、松﨑洋海、関根大喜、田中真琴、野村泰之、鴫原俊太郎、池田　稔：T2N0M0 声門扁平上皮癌の CBDCA 併用同時放射線療法と救済手術, 第 20 回日本頭頸部外科学会総会, 東京, 2010 年 1 月

73. 野村泰之、辻　賢三、工藤逸大、浅川剛志、鴫原俊太郎、古阪　徹、池田　稔：

病院耳鼻咽喉科コストの低減と増益化について，第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 仙台, 2010 年 5 月

74. 浅川剛志、古阪　徹、野口雄五、松崎洋海、関根大喜、柴　和孝、池田　稔：大唾液腺腫瘍手術例の検討，第 23 回日本口腔咽頭科学会総会, 東京, 2010 年 9 月

75. 鴫原俊太郎、長谷川　央、増田　毅、松﨑洋海、浅川剛志、野口雄五、野村泰之、池田　稔：当科における聴神経腫瘍経過観察症例，第 20 回日本耳科学会総会, 松山, 2010 年 10 月

76. 浅川剛志：大唾液腺腫瘍手術例の検討，第 24 回城北・埼玉南部耳鼻咽喉科学術集会, 東京, 2010 年 10 月

77. 鴫原俊太郎、野村泰之、浅川剛志、平井良治、亀井千春、池田　稔：内リンパ水腫症例の聴力に対する鼓膜チューブ留置術の効果，第 55 回日本聴覚医学会総会, 奈良, 2010 年 11 月

78. 浅川剛志、古阪　徹、野口雄五、松崎洋海、関根大喜、柴　和孝、池田　稔：大唾液腺腫瘍手術例の検討，第 21 回日本頭頸部外科学会総会, 宇都宮, 2011 年 1 月

79. 鴫原俊太郎、野村泰之、野口雄五、浅川剛志、平井良治、柴　和孝、増田　毅、浅野友規美、飯國芙紗子、池田　稔：めまいに対する鼓膜チューブ留置術の効果，第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 京都, 2011 年 5 月

80. 飯国芙紗子、浅川剛志、古阪　徹、関根大喜、柴　和孝、増田　毅、池田　稔：耳下腺良性腫瘍術後顔面神経麻痺の検討，第 34 回顔面神経研究会, 東京, 2011 年 6 月

81. 長谷川　央、浅川剛志、古阪　徹、樋口雄将、戸井輝夫、池田　稔：反復性顔面神経麻痺を呈した上咽頭腫瘍の 1 例，第 34 回顔面神経研究会, 東京, 2011 年 6 月

82. 長谷川　央、古阪　徹、浅川剛志、関根大喜、鈴木啓誉、池田　稔：耳下腺悪性腫瘍と顔面神経障害，第 35 回顔面神経研究会, 福島, 2012 年 5 月

83. 三浦正稔、鴫原俊太郎、野村泰之、浅川剛志、増田　毅、戸井輝夫、上浦大輝、池田　稔：中耳に原発した内反性乳頭腫の一例，第 22 回日本耳科学会, 名古屋, 2012 年 10 月

84. 友松裕貴、田中真琴、三浦正稔、鈴木啓誉、浅川剛志、古阪　徹、池田　　稔：舌正中切開で舌根部腫瘍を摘出した２例，第 197 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会,東京,2012 年 11 月

85. 鈴木啓誉、浅川剛志、友松裕貴、三浦正稔、戸井輝夫、田中真琴、池田　稔：気管切開術後に気管腕頭動脈瘻を発症した高度側彎児の一例，第 64 回日本気管食道科学会,東京,2012 年 11 月

②特別発表

ワークショップ

1. 遠藤壮平、江角真理子、松崎洋海、工藤逸大、浅川剛志、松山一夫、木田亮紀：Micoroarray による口腔扁平上皮癌に共通して発現変化を示す遺伝子の検索(ワークショップ：発症過程)，第 63 回日本癌学会,福岡,2004 年 9 月

Ⅱ論文

①原著論文

1. 吉川琢磨、吉田晋也、浅川剛志：当科における甲状腺穿刺吸引細胞診の検討,日本気管食道科学会会報，53(1):27-32,2002.

2. 浅川剛志、木田亮紀、遠藤壮平、鴫原俊太郎、佐藤正美：当科における喉頭肉芽腫症，板橋医師会医学会誌，2002(7):171-174,2003.

3. 浅川剛志、吉田晋也、吉川琢磨、岸田　覚：当科における頸部リンパ節生検の検討，日本気管食道科学会会報，54:32-37,2003.

4. Asakawa T, Esumi M, Endo S, Kida A, Ikeda M: Tongue cancer patients have a high frequency of allelic loss at the von Hoppel-Lindau gene and other loci on 3p, CANCER,　112:527-534,2008.

5. 野村泰之、濱田奈緒子、松山一夫、工藤逸大、松崎洋海、関根大喜、平井良治、浅川剛志、野口雄五、辻　賢三、鴫原俊太郎、池田　稔：外来診療報酬の査定削減への取り組み-よりよい病院をめざして，日大医学雑誌，67(3):167-173,2008.

6. 古阪　徹、浅川剛志、関根大喜、松崎洋海、池田　稔：舌扁平上皮癌に対する超選択的動注化学療法と放射線同時併用療法，　口腔・咽頭科，23(2):243-247,2010.

7. 飯國芙沙子、浅川剛志、古阪　徹、野村泰之、池田　稔：耳下腺良性腫瘍に

おける術後顔面神経麻痺の検討, Facial nerve research, 31:89-91,2011.

②症例報告

1. 鯵坂　涼、浅川剛志：耳下腺睡石の一症例, 銚子市立総合病院医報, 2000:3,2000.

2. 浅川剛志、吉田晋也、吉川琢磨、岸田覚：多発性骨髄腫に移行した髄外性形質細胞腫の１症例, 耳鼻咽喉科頭頸部外科, 74(8):523-526,2002.

3. 浅川剛志、木田亮紀、小林大輔、関根大喜：左後頸部海綿状血管腫の１症例, JOHNS, 22(3):493-497,2006.

4. 野村泰之、小川克彦、増田　毅、平井良治、松山一夫、浅川剛志、野口雄五、濱田敬永、鴫原俊太郎、鴫原じゅん子、齋藤雄一郎、池田　稔：頭位変換性めまいが主訴であった小脳梗塞の１症例, 日大医学雑誌, 66(4):337-341,2007.

5. Nomura Y, Tsuji K, Noguchi Y, Matsuyama K, Onoda K, Kudo I, Asakawa T, Matsuzaki H, Hirai R, Sekine H, Kumagai M, Furusaka T, Ikeda M, Oinuma T: EPITHELIAL-MYOEPITHELIAL CARCINOMA ARISING IN THE NASAL CAVITY, The Nihon University Jouenal of Mediine, 50:133-138,2008.

6. 戸井輝夫、野村泰之、浅川剛志、鴫原俊太郎、増田　毅、平井良治、池田篤生、岸　博行、柴　和孝、松山一夫、池田　稔、水谷智彦：めまいを主訴とした多発性硬化症例の検討, 耳鼻咽喉科臨床, 102(11):903-909,2009.

7. 池田篤生、浅川剛志、野村泰之、平井良治、戸井輝夫、工藤逸大、鴫原俊太郎、池田　稔、杉谷雅彦：口腔咽頭粘膜に原局した尋常性天疱瘡の２例, 耳鼻咽喉科臨床, 102 (12) : 1039-1043,2009.

8. 浅野友規美、浅川剛志、関根大喜、大荷澄江、池田　稔：転移性肺腫瘍・肝腫瘍の原発病変に対する診断が困難であった早期舌癌術後症例, JOHNS 26:809-813,2010.

9. 長谷川　央、浅川剛志、古阪　徹、樋口雄将、戸井輝夫、中里秀史、野村泰之、池田　稔：反復性顔面神経麻痺を呈した上咽頭腫瘍の一例, Facial nerve research, 31: 115-116,2011.

10. Asakawa T, Esumi M, Endo S, Kida A, Ikeda M: A mutation at IVS1+5 of the von Hippel-Lindau gene resulting in intron retention in transcripts is not pathogenic in a patient with a tongue cancer? : case report, BMC

medical genetics, 13:23,2012.